

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC
CENTRO DE APOIO MULTIDISCIPLINAR – CAM

DISSERTAÇÃO

ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DE *Fusarium decemcellulare* AGENTE
CAUSAL DO SUPERBROTAMENTO EM GUARANAZEIRO (*Paullinia*
cupana var. *sorbilis*)

IGOR KELVYN CAVALCANTE LOBO

Manaus – AM

2016

IGOR KELVYN CAVALCANTE LOBO

ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DE *Fusarium decemcellulare* AGENTE
CAUSAL DO SUPERBROTAMENTO EM GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana*
var. *sorbilis*)

Orientador: Dr. Gilvan Ferreira da Silva

Co-orientador: Dr. Michel Eduardo Beleza Yamagishi

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Amazonas
como requisito para obtenção de título de
Mestre em Biotecnologia.

Unidade executora

Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Prazo de execução

24 meses

Fonte financiadora

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

Manaus – AM

2016

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

L799a Lobo, Igor Kelvyn Cavalcante
Análise do transcriptoma de *Fusarium decemcellulare* agente causal do superbrotamento em guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) / Igor Kelvyn Cavalcante Lobo. 2016
94 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Gilvan Ferreira da Silva
Coorientador: Michel Eduardo Beleza Yamagishi
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. transcriptoma. 2. superbrotamento. 3. guaranazeiro. 4. *Fusarium decemcellulare* (fungo). I. Silva, Gilvan Ferreira da II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

IGOR KELVYN CAVALCANTE LOBO

**ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DE *Fusarium decemcellulare* AGENTE
CAUSAL DO SUPERBROTAMENTO EM GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana*
var. *sorbilis*)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Amazonas
como requisito para obtenção de título de
Mestre em Biotecnologia.

APROVADO em 15 de julho de 2016

Dr. Gilvan Ferreira da Silva

EMBRAPA-CPAA

Dra. Andrea Ghelfi

UFAM

Dr. Rogério Eiji Hanada

INPA

Dr. Gilvan Ferreira da Silva

Orientador

Manaus – AM

2016

Aos meus avós: Ismael Cavalcante e Maria Ivanilde, pais, irmãos, tios e demais familiares, pelo apoio e incentivo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Amazonas, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade concedida para a realização do Mestrado;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Dr. Gilvan Ferreira da Silva, pela atenção, orientação e enorme contribuição na minha formação, desde a Iniciação Científica.

Ao Dr. Michel Eduardo Beleza Yamagishi, pela atenção, orientação no ramo da Bioinformática, área que almejo daqui em diante e, portanto, pela também enorme contribuição na minha formação.

Ao Msc. Giovanni Marques de Castro, ao Dr. Adhemar Zerlotini Neto e à Dra. Poliana Fernanda Giacchetto, pelo apoio em algumas análises e esclarecimento de muitas dúvidas durante a estadia na Embrapa Informática Agropecuária (Campinas).

Ao Dr. Adolfo José da Mota, pelo apoio financeiro e incentivo no primeiro curso de Bioinformática que fiz, crucial para o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Dr. José Odair Pereira, à Dra. Nelcimar Reis Sousa e ao Dr. José Clério Rezende Pereira pelo financiamento dos custos de sequenciamento do genoma e transcriptoma de *Fusarium decemcellulare*.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, que muito me ajudaram durante os procedimentos de bancada, de campo e também me incentivaram muito ao longo do trabalho;

Aos amigos pessoais, namorada e familiares, que também me deram grande apoio me representando na UFAM quando estive fora e aliviando as tensões do dia-a-dia;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O guaraná da Amazônia é muito apreciado por suas propriedades medicinais e energéticas, sendo o Amazonas a segunda contribuição nacional na produção. Esta produção, entretanto, acaba sendo afetada por uma das principais doenças da cultura: o superbrotamento, que tem como agente causal o fungo *Fusarium decemcellulare*. Os sintomas da doença são: o superbrotamento de gemas, a hiperplasia e hipertrofia floral e as galhas do caule. Em diversos estudos, associa-se sintomas semelhantes aos do superbrotamento a uma produção, ou ainda modulação, do hormônio auxina por parte do patógeno. Assim, o objetivo deste trabalho foi de identificar genes de vias de síntese do hormônio auxina em *Fusarium decemcellulare* e analisar diferenças entre perfis transcriptômicos de isolados homotáticos e heterotáticos. Foram sequenciadas 12 bibliotecas, referentes a seis réplicas biológicas (três isolados homotáticos e três isolados heterotáticos de *F. decemcellulare*) para cada condição de crescimento: meios BD e MS. O controle de qualidade das *reads* foi realizado pelos *softwares* Trimmomatic-0.33, FastQC e SortMeRNA. O mapeamento de *reads* no genoma de referência foi realizado com o *software* TopHat2 e a montagem do transcriptoma final em cada condição, bem como o cálculo de expressão diferencial, foram realizados através do pacote Cufflinks (Cufflinks, Cuffmerge e Cuffdiff). A anotação funcional dos transcritos foi realizada através das ferramentas KEGG *Automatic Annotation Server* (KAAS) e Blast2GO. Para verificar a habilidade de *F. decemcellulare* em sintetizar auxina, os isolados FDC200 e CML 2241 foram crescidos em meio MS, o qual foi posteriormente analisado por meio de cromatografia líquida de ultra performance. Foram identificados, a nível genômico e transcriptômico, duas putativas vias de síntese do hormônio auxina: a via do indol-acetaldeído, mais o desvio desta via, além da via da triptamina. A expressão destes genes foi detectada tanto em indivíduos heterotáticos, quanto em homotáticos. Foi identificado ainda, também a nível genômico e transcriptômico, um gene de uma putativa aminociclopropano (ACC) deaminase, responsável por degradar o precursor do hormônio etileno, o ACC. Além disso, o hormônio auxina foi detectado no meio de cultura MS, onde foram crescidos os isolados FDC200 e CML2241, confirmando biossíntese por parte do fungo. Os dados aqui obtidos sugerem, portanto, que *Fusarium decemcellulare* estaria se utilizando da síntese de auxina e bloqueio da produção de etileno da planta para burlar o sistema de defesa da hospedeira, sendo os sintomas do

superbrotamento em guaranazeiro uma consequência do desequilíbrio hormonal causado pelo fungo.

ABSTRACT

Guarana from Amazonia is much appreciated for its medicinal and energizing properties, and the Amazonas state is the second national contribution in production. However, this production has been affected by a major disease of culture: the overbudding, whose causal agent is the fungus *Fusarium decemcellulare*. The symptoms of the disease are overbudding, hyperplasia and hypertrophy floral and stem galls. In other studies, the development of symptoms similar to those overbudding's symptoms is associated to production, or modulation, of auxin hormone by the pathogen. Thus, this study aimed identify genes from biosynthesis pathways of auxin hormone in *Fusarium decemcellulare* and analyze differences between transcriptomic profiles of homothallic and heterothallic individuals. Twelve libraries were sequenced referring to six biological replicates (three homothallic individuals and three heterothallic individuals) for each growth condition: BD and MS media. Quality control of reads was carried out by Trimmomatic-0.33, FastQC and SortMeRNA softwares. Mapping reads to reference genome was done with TopHat2 software and the transcriptome assembly in each condition, as well as differential expression, were performed using the Cufflinks package (Cufflinks, Cuffmerge and Cuffdiff). Functional annotation of transcripts was performed by KEGG Automatic Annotation Server (KAAS) and Blast2GO. To verify the ability to synthesize auxin, FDC200 and CML2241 were grown in MS medium, which was then analyzed by ultra performance liquid chromatography. Genes from two putative auxin biosynthesis pathway were identified at genomic and transcriptomic levels: the indole-acetaldehyde pathway, its deviation and the tryptamine pathway. The expression of these genes was detected in both individuals, heterothallic and homothallic. A gene from a putative aminocyclopropane (ACC) deaminase also has been identified at genomic and transcriptomic levels, which is responsible for degrading the precursor of hormone ethylene, ACC. Furthermore, the auxin hormone was detected in the MS medium, where FDC200 and CML2241 were grown, confirming biosynthesis of IAA (indole-3-acetic acid) by the fungus. Therefore, the data obtained suggest the use of auxin biosynthesis and blocking of plant ethylene production by *Fusarium decemcellulare* to evade the host defense system, and the symptoms of overbudding in guarana plant would be a consequence of hormonal imbalance caused by the fungus.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Superbrotamento de gemas vegetativas. **A:** visão geral de ramo infectado. **B:** visão ampliada de região com lançamentos de ramos secundários. **C:** visão ampliada – entrenós mais curtos.....10
- Figura 2.** Superbrotamento de inflorescências. **A:** visão geral de ramo com inflorescências infectado. **B:** visão ampliada.....11
- Figura 3.** Hipertrofia e hiperplasia das inflorescências. **A:** visão geral de inflorescência infectada. **B:** visão ampliada – flores compactas e endurecidas.....13
- Figura 4.** Inflorescências sadias.....14
- Figura 5.** Galhas do caule. **A:** visão geral de galha no caule. **B:** visão ampliada – massa compacta e desorganizada.....15
- Figura 6.** Cluster gênico contendo os dois putativos genes dos primeiros passos da via do indol-acetaldeído, localizado no cromossomo 12 do isolado FDC307 de *Fusarium decemcellulare*. **A:** Passo 1 da via do indol-acetaldeído – Putativa aminotransferase de aminoácidos aromáticos. **B:** Passo 2 da via do indol-acetaldeído – Putativa piruvato descarboxilase. **C:** Fator de transcrição Zn(II)2Cys6. A orientação das setas significa o sentido da transcrição. Setas amarelas representam as CDS (*Coding DNA sequence*) e os traços entre elas representam íntrons. As setas verdes representam o gene e as vermelhas o RNA mensageiro.....30
- Figura 7.** Putativo gene do passo 1 da via do indol-acetaldeído no cromossomo 3 do isolado FDC307 de *Fusarium decemcellulare*. **A:** Putativa citocromo P450. **B:** Passo 1 da via do indol-acetaldeído - putativa aminotransferase de aminoácidos aromáticos. A orientação das setas significa o sentido da transcrição. Setas amarelas representam as CDS (*Coding DNA sequence*) e os traços entre elas representam íntrons. As setas verdes representam o gene e as vermelhas o RNA mensageiro.....31

Figura 8. Putativo gene do passo 3 da via do indol-acetaldeído no cromossomo 9 do isolado FDC307 de *Fusarium decemcellulare*. **A:** Putativa 7-alfa-hidroxiesteroide desidrogenase. **B:** Passo 3 da via do indol-acetaldeído - putativa indol-acetaldeído desidrogenase. **C:** Putativa proteína cis-3-ácido cloroacrílico. A orientação das setas significa o sentido da transcrição. Setas amarelas representam as CDS (*Coding DNA sequence*) e os traços entre elas representam íntrons. As setas verdes representam o gene e as vermelhas o RNA mensageiro.....31

Figura 9. Putativo gene do passo 3 da via do indol-acetaldeído no cromossomo 2 do isolado FDC307 de *Fusarium decemcellulare*. **A:** Putativa proteína HSF (*heat shock factor*). **B:** Putativa peptidil-prolil isomerase CWC27. **C:** Passo 3 da via do indol-acetaldeído - putativa indol-acetaldeído desidrogenase. **D:** Proteína hipotética. A orientação das setas significa o sentido da transcrição. Setas amarelas representam as CDS (*Coding DNA sequence*) e os traços entre elas representam íntrons. As setas verdes representam o gene e as vermelhas o RNA mensageiro.....32

Figura 10. Putativa proteína YUCCA, componente do desvio da via do indol-acetaldeído, no cromossomo 2 do isolado FDC307 de *Fusarium decemcellulare*. **A:** Putativa proteína YUCCA (desvio da via do indol-acetaldeído). **B:** Putativa L-gulonolactona oxidase. **C:** Proteína hipotética. A orientação das setas significa o sentido da transcrição. Setas amarelas representam as CDS (*Coding DNA sequence*) e os traços entre elas representam íntrons. As setas verdes representam o gene e as vermelhas o RNA mensageiro.....33

Figura 11. Putativo gene do passo 1 da via da triptamina, no cromossomo 5 do isolado FDC307 de *Fusarium decemcellulare*. **A:** Putativa lisofosfolipase NTE1. **B:** Passo 1 da via da triptamina - Putativa descarboxilase de aminoácidos aromáticos. **C:** Putativa proteína arrestina. A orientação das setas significa o sentido da transcrição. Setas amarelas representam as CDS (*Coding DNA sequence*) e os traços entre elas representam íntrons. As setas verdes representam o gene e as vermelhas o RNA mensageiro.....34

Figura 12. Putativo gene do passo 2 da via da triptamina, no cromossomo 11 do isolado FDC307 de *Fusarium decemcellulare*. **A:** Putativa proteína associada a resistência multidrogas 1. **B:** Passo 2 da via da triptamina - Putativa amina oxidase. A orientação das setas significa o sentido da transcrição. Setas amarelas representam as CDS (*Coding DNA sequence*) e os traços entre elas representam íntrons. As setas verdes representam o gene e as vermelhas o RNA mensageiro.....34



Figura 13. Duas prováveis vias de síntese de auxina em <i>Fusarium decemcellulare</i> .  Via do indol-acetaldeído  Via da triptamina. 1.14.13.168: Monooxygenase YUCCA. 2.6.1.27: Aminotransferase de aminoácidos aromáticos. 4.1.1.74: Piruvato descarboxilase. 1.2.1.3: Indol-acetaldeído desidrogenase. 4.1.1.28: Descarboxilase de aminoácidos aromáticos. 1.4.3.22: Amina oxidase. Estruturas químicas com base no banco de dados KEGG.....	37
Figura 14. Via do indol-acetaldeído. 2.6.1.27: Aminotransferase de aminoácidos aromáticos. 4.1.1.74: Piruvato descarboxilase. 1.2.1.3: Indol-acetaldeído desidrogenase. Estruturas químicas com base no banco de dados KEGG.....	39
Figura 15. Desvio da via do indol-acetaldeído. 1.14.13.168: Monooxygenase YUCCA. 2.6.1.27: Aminotransferase de aminoácidos aromáticos. 4.1.1.74: Piruvato descarboxilase. 1.2.1.3: Indol-acetaldeído desidrogenase. Estruturas químicas com base no KEGG.....	40
Figura 16. Via da triptamina. 4.1.1.28: Descarboxilase de aminoácidos aromáticos. 1.4.3.22: Amina oxidase. 1.2.1.3: Indol-acetaldeído desidrogenase. Estruturas químicas com base no KEGG.....	41
Figura 17. Expressão em FPKM dos genes componentes da via do indol-acetaldeído e seu desvio e via da triptamina, a nível dos tipos sexuais, heterotáticos e homotáticos, de <i>Fusarium decemcellulare</i> . A. Genes expressos em meio MS. B. Genes expressos em meio BD.....	43
Figura 18. Comparação do número de genes diferencialmente expressos identificados em isolados heterotáticos e homotáticos de <i>Fusarium decemcellulare</i> crescidos em BD (A) e MS (B). No eixo Y de A , escala representando o total de 1649 genes diferencialmente expressos em BD. No eixo Y de B , escala representando o total de 1466 genes diferencialmente expressos em MS.....	45
Figura 19. Termos GO (top 50) associados a genes mais expressos em heterotáticos (em cima) e homotáticos (embaixo) na condição BD.....	47
Figura 20. Termos GO (top 50) associados a genes mais expressos em heterotáticos (em cima) e homotáticos (embaixo) na condição MS.....	48

Figura 21. Concordância entre os tempos de retenção (5,3 minutos) do padrão analítico – AIA e das amostras provenientes do crescimento de *Fusarium decemcellulare* em meio de cultura MS (FDC200 e CML2241).....50

Figura 22. Íons fragmentos das amostras FDC200 e CML2241 em concordância com o mecanismo de fragmentação do padrão analítico: formação de um íon produto com m/z 130.06 a partir de um íon precursor de m/z 174.05.....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Contribuição do Amazonas na produção nacional de guaraná em grãos – Área, Produtividade e Produção.....	5
Tabela 2. Níveis de GH3 e conjugados de AIA em outras interações planta-patógeno. Adaptação do trabalho de Ludwig-Muller (2015).....	21
Tabela 3. Isolados de <i>Fusarium decemcellulare</i> que serão crescidos em meio BD e meio MS – triptofano.....	24
Tabela 4. <i>Reads</i> de RNA-seq provenientes de <i>Fusarium decemcellulare</i> crescido nos meios BD e MS, após 15 dias.....	36
Tabela 5. Detecção de transcritos dos passos relacionados às prováveis vias de síntese de auxina em diferentes isolados de <i>Fusarium decemcellulare</i>	38
Tabela 6. Vias de síntese do hormônio auxina utilizadas por <i>Fusarium decemcellulare</i> crescido nos meios de cultura BD e MS.....	44
Tabela 7. Aminociclopropano deaminase expressa por <i>Fusarium decemcellulare</i>	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. O Guaraná: importância social, cultural e econômica	3
2.2. <i>Fusarium decemcellulare</i>	6
2.2.1. Classificação e Morfologia	6
2.2.2. O sistema <i>mating-type</i>	7
2.2.3. Doenças e Hospedeiros	8
2.2.4. O superbrotamento em guaranazeiro (<i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i>)	9
2.2.5. Estudos com <i>Fusarium decemcellulare</i>	16
2.3. RNA-seq – a técnica aplicada a outros fitopatógenos	17
2.4. Homeostase de Auxina em interações planta-patógeno	19
3. OBJETIVOS	23
3.1. Geral	23
3.2. Específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Condições de cultivo - RNA-seq	24
4.2. Extração de RNA, preparação da biblioteca e sequenciamento	25
4.3. Detecção de genes de vias de síntese de auxina – do controle de qualidade de <i>reads</i> à montagem do transcriptoma final e localização dos genes	25
4.3.1. Controle de qualidade – Trimmomatic-0.33, FastQC e SortMeRNA	26
4.3.2. Mapeamento de <i>reads</i> e montagem do transcriptoma final	26
4.3.3. Identificação de genes relacionados à via de biossíntese de auxina no genoma e transcriptoma final de <i>F. decemcellulare</i>	26
4.3.4. Anotação Funcional	27
4.4. Detecção de AIA secretado por <i>Fusarium decemcellulare</i>	27
5. RESULTADOS	29
5.1. Localização de genes de vias de síntese de auxina – nível genômico	29
5.2. Sequenciamento, controle de qualidade e mapeamento de <i>reads</i>	35
5.3. Detecção de genes de vias de síntese de auxina – nível transcriptômico	37
5.4. Genes diferencialmente expressos	45

5.5. Detecção de AIA secretado por <i>Fusarium decemcellulare</i>	49
6. DISCUSSÃO	51
7. CONCLUSÕES	60
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
10. ANEXOS	80

1. INTRODUÇÃO

O guaraná comercial da Amazônia é produzido a partir das sementes de *Paullinia cupana* var. *sorbilis*, o guaranazeiro, e é muito apreciado por suas propriedades medicinais, afrodisíacas, energéticas e cosméticas (Henman, 1982; Duke, 2002, Majhenic, 2007; Caniceiro, 2012). O Brasil é o único produtor mundial em escala comercial, sendo o Amazonas o segundo estado com maior produção, estando atrás somente da Bahia (CONAB, 2014). No Amazonas, esta produção acaba sendo prejudicada pela proliferação de doenças, estando a antracnose e o superbrotamento entre as duas doenças que mais acometem a cultura.

O superbrotamento é causado pelo fungo *Fusarium decemcellulare* e caracteriza-se por apresentar os sintomas de galhas no caule, hiperplasia e hipertrofia floral e superbrotamento de gemas (Batista e Bolkan, 1982). As galhas consistem em uma proliferação de uma massa compacta e desorganizada, semelhantes a tumores, podendo ocorrer por toda a planta; a hiperplasia e hipertrofia floral fazem com que as flores tomem aspecto compacto e endurecido, o que impede a polinização, com posterior e precoce secamento dos tecidos; e o superbrotamento de gemas vegetativas e/ou florais consiste em brotações sucessivas ao longo dos ramos, a partir de pontos muito próximos uns dos outros (Araújo *et al.*, 2006). Até 100% da produção de uma planta acometida com o superbrotamento pode ser comprometido, devido aos sítios de forte competição que representam as partes afetadas para as partes sadias da planta.

Os sintomas do superbrotamento em guaranazeiro assemelham-se com outros sintomas causados também por *F. decemcellulare* em outras culturas. Em mangueira e cacaueiro também causa galhas e superbrotamentos, além de sintomas como dilatações (cancrose) em fruteira-do-conde (Junqueira *et al.*, 2001; Ploetz *et al.*, 1996; Vicente *et al.*, 2012; Guimarães, 2013). Estes sintomas observados em diferentes culturas estão ancorados em um mesmo princípio: multiplicação exagerada e desordenada de células. A literatura apresenta, ainda, diversos outros estudos com diferentes organismos, entre eles bactérias, fungos, insetos, nematoides, que produzem auxina e são capazes de causar galhas em seus hospedeiros (Maor *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009; Straka *et al.*, 2011; Gisbert *et al.*, 2013). As análises destes trabalhos revelam um desequilíbrio do hormônio durante a interação planta-patógeno, uma vez que além de exercer importante papel no crescimento e desenvolvimento da planta, o hormônio também está relacionado com a resposta de defesa da planta a infecções (Yang *et al.*, 2007; Kazan e Manners,

2009). Buscando a homeostasia do hormônio, a planta conta com um mecanismo de regulação baseado em proteínas da família GH3, capazes de conjugar a auxina em excesso principalmente com aminoácidos, açúcares e peptídeos. As conjugações têm por finalidade estocar, inativar ou conduzir à degradação o hormônio em demasia em determinado tecido (Woodward e Bartel, 2005; Ludwig-Müller, 2011). Segundo Ludwig-Muller (2015), no seu recente levantamento, os níveis de proteínas GH3, auxina e conjugados estão intimamente ligados à resistência ou suscetibilidade do hospedeiro à infecção.

Com o avanço nas tecnologias de sequenciamento, métodos acurados de obtenção de sequências de transcritos (RNA-seq), bem como análises destas sequências, surgiram e contribuem significativamente com o estudo de expressão de genes (O'Connell *et al.*, 2012; Thakur *et al.*, 2013; Ke *et al.*, 2014; Alkan *et al.*, 2015). Deste modo, compreender o perfil transcriptômico de *F. decemcellulare*, principalmente quanto a possíveis genes de vias de biossíntese de auxina, poderá contribuir fortemente com o desenvolvimento de táticas de combate à doença, angariando dados importantes ao melhoramento genético.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O Guaraná: importância social, cultural e econômica

Paullinia cupana var. *sorbilis* (Mart.) Ducke é uma trepadeira lenhosa da família Sapindaceae, popularmente conhecida como guaranazeiro, encontrada também na forma de semi-arbusto, quando cultivado. É uma planta alógama, perene e, em condições favoráveis, pode viver até 40 anos. O guaraná é produzido a partir das sementes de *P. cupana* var. *sorbilis*, possuindo propriedades medicinais e estimulantes. Além disso, o guaraná também é muito apreciado na gastronomia, valendo ressaltar sua utilização ainda nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (Henman, 1982; Nascimento Filho *et al.*, 1993; Souza, 2011).

Historicamente, o guaraná exerce importante papel social, cultural e religioso no desenvolvimento da comunidade amazônica. Atualmente, além de comprovadas todas as suas propriedades medicinais o guaraná continua apreciado culturalmente e religiosamente. A história de cultivo do guaraná, desde os primórdios com os índios Saterés, revela uma associação mística da sua manipulação com o ritualismo religioso que acompanha os costumes da tribo até os dias de

hoje. Tal sistematização, que se estende do plantio ao preparo e consumo, tem fundamentação religiosa e somente cede espaço às demais vertentes de usos do guaraná quando em posse do comerciante. Vale ressaltar, portanto, a importância do guaraná para o povo amazonense como patrimônio cultural, uma vez que consiste em um traço do hábito regional, já enraizado pelo tempo (Souza, 2011).

A partir deste uso empírico, pesquisas tendo o guaraná como objeto de estudo evoluíram, a fim de investigar suas propriedades tão estimadas pelos povos da região e que tanto são atrativas ao consumo. Segundo Tfouni *et al.* (2007), ao comparar níveis médios de cafeína no guaraná em pó com o pó de café, verificou-se que metade das amostras analisadas exibiram teor de cafeína, aproximadamente, três vezes maior. Diante disso, o guaraná tem grande aplicação medicinal: tem propriedades analgésica, anti-inflamatória, afrodisíaca, bronco-relaxante, diurética, gastroestimulante, além de termogênica e tônica. É indicado a cardiopatias, diarreia, disenteria, fadiga mental, melhorando a performance cognitiva, no controle de doenças inflamatórias e autoimunes, malária, reumatismo, estresse, retenção de água. Apresenta também atividade antimicrobiana e antioxidante, prevenindo, inclusive, a formação de placas dentárias (Duke, 2002; Basile *et al.*, 2005; Yamaguti-Sasaki *et al.*, 2007; Kennedy *et al.*, 2008; Caniceiro, 2012). A partir destas propriedades, uma gama de produtos à base de guaraná é extensamente comercializada. Na gastronomia é muito utilizado na elaboração de produtos de chocolate, mas é na indústria de bebidas que se encontra a sua maior utilização, sobretudo compondo bebidas gaseificadas. O extrato das sementes de *P. cupana* var. *sorbilis* serve de base também para outros produtos como bebidas energéticas, suplementos alimentares e até mesmo produtos naturais para perda de peso (Boozer, 2001; Harmerski *et al.*, 2013). Na indústria de cosméticos, o guaraná consiste em uma importante matéria-prima, uma vez que apresenta fortes atividades antimicrobianas e antioxidantes, podendo ser usado, portanto, em formulações cosméticas e farmacêuticas (Majhenic *et al.*, 2007). O guaraná, para formulação dos produtos mencionados ou para consumo direto, também é comercializado nas suas formas de guaraná em bastão (a forma mais antiga de comercialização, desenvolvida pelos índios Maués), guaraná em rama (sementes torradas utilizadas na produção de xaropes e extratos de guaraná) e guaraná em pó (sementes torradas e moídas, utilizadas na preparação de bebidas, sorvetes, cremes) (Tavares *et al.*, 2005).

Diante do exposto, o guaraná figura como um importante contribuinte para a economia regional e nacional. Segundo dados da CONAB, o Levantamento de Avaliação de Safra realizado

pelo IBGE para os anos de 2014 e 2015 (CONAB, 2015) ranqueia o Amazonas como o segundo estado da federação em contribuição na produção nacional de guaraná em grãos, estando atrás do estado da Bahia. Em termos de produtividade e produção, os números são ascendentes, mostrando para o ano de 2015 uma participação de 23,4% do Amazonas no total da produção do país (Tabela 1) (CONAB, 2016).

Tabela 1. Contribuição do Amazonas na produção nacional de guaraná em grãos – Área, Produtividade e Produção.

	Área colhida (hectares)		Produtividade (kg/hectare)		Produção (toneladas)		Participação (%)	
	Safra 2014	Safra 2015	Safra 2014	Safra 2015	Safra 2014	Safra 2015	Produção 2014	Produção 2015
Brasil	11348	11767	313	311	3554	3659	100	100
Bahia	6719	6500	401	400	2691	2600	71,1	71,3
Amazonas	4087	4912	153	174	624	855	23,4	23,4

Dados da CONAB do intervalo que compreende os anos de 2009 a 2014 mostram que, até 2013, houve recuo na área colhida de 22,18% e na produção em 20,16%, embora a produtividade tenha registrado um aumento de 2,7%. A redução na produção pode ser explicada, neste dado intervalo de tempo, à erradicação de guaranazeiros antigos que não contribuíam mais com a produção, não havendo replantio nas mesmas proporções (CONAB, 2014). Há ainda que ressaltar que a produção de 2013 caiu de aproximadamente 3,9 mil toneladas (CONAB, 2012) para 3,6 mil toneladas, registrando nova queda no ano de 2014 para 3,5 mil toneladas (CONAB, 2015). As condições climáticas adversas estão entre os principais fatores apontados como causa deste déficit registrado na produção (CONAB, 2013).

O mesmo fator de condições climáticas da região amazônica favorece também a diversidade de micro-organismos. Logo, as causas já mencionadas apontadas pela CONAB acabam somando-se ainda à ocorrência de doenças causadas por fitopatógenos, que acometem o guaranazeiro e também comprometem a produção. As condições de plantio a pleno sol, a disposição das plantas de modo contíguo, más condições de drenagem, ferimentos causados

durante roçamento e coroamento e ambiente excessivamente úmido (em casos de viveiro) são pontos importantes, característicos da rotina de cultivo e que favorecem a disseminação e instalação de doenças (Duarte *et al.*, 1983; Castro, 1992).

Várias são as doenças que prejudicam a produtividade do guaraná. Dentre elas, pode-se destacar a podridão vermelha das raízes (*Ganoderma philippii*), a mancha angular (*Xanthomonas campestris* patovar *paullinae*), a requeima-das-mudas (*Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*) e as duas principais doenças da cultura, a antracnose (*Colletotrichum guaranicola*) e o superbrotamento (*Fusarium decemcellulare*) (Duarte *et al.*, 1983; Batista, 1983). Esta última, o superbrotamento, é de crescente incidência e forte contribuição para a baixa de produtividade do guaraná no estado do Amazonas. A doença desencadeia uma multiplicação desordenada de células nas gemas vegetativas e florais da planta, além de provocar galhas no caule, o que resulta em sítios de competição entre partes infectadas e ramos e/ou folhas sadias. Tal injúria ocorre em detrimento do desenvolvimento estrutural e, consequentemente, da produtividade da planta. O superbrotamento é observado em todos os estádios de desenvolvimento do guaranazeiro e tem sua etiologia atribuída ao fungo *Fusarium decemcellulare* (Batista e Bolkan, 1982).

2.2. *Fusarium decemcellulare*

2.2.1. Classificação e Morfologia

Fusarium decemcellulare está classificado taxonomicamente no domínio *Eukarya*, reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, classe *Sordariomycetes*, ordem *Hypocreales*, família *Nectriaceae*, gênero *Fusarium*, complexo de espécies *Fusarium decemcellulare* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=57161>).

Em meio BDA, apresenta colônias de crescimento rápido, atingindo de 7,5 a 8,0 cm de diâmetro, em 10 dias a 25 °C. O micélio aéreo se apresenta de forma abundante e flocosa, com breve surgimento de pó pela produção de microconídios. A pigmentação, nos primeiros dias, consiste em uma cor de branco ao creme, mudando depois para rosa acinzentado, carmim ou roxo, ou ainda amarelo ocre (Gerlach e Nirenberg, 1982). *F. decemcellulare* inicia o processo de esporulação depois de 3 a 5 dias no micélio aéreo, na forma de microconídios dispostos em cadeia ou falsas cabeças. Mais caracteristicamente, estas culturas produzem esporodóquio de coloração amarelada, das quais gotas de exsudato podem se formar e conferir à colônia uma aparência úmida.

Os macroconídios geralmente são longos, robustos e de paredes espessas. Têm a morfologia celular apical arredondada e sem corte, enquanto que a morfologia basal tem o formato de um pé. Podem ser encontrados de 5 a 9 septos nos macroconídios, sendo mais comum de 7 a 9 septos. São geralmente abundantes no esporodóquio, cujos macroconídios costumam ser uniformes quanto a forma e tamanho. Quanto aos microconídios, assumem uma forma oval e não são septados, estando geralmente dispostos na forma de longas cadeias, ou ocasionalmente falsas cabeças (Gerlach e Nirenberg, 1982; Leslie e Summerell, 2006). Tem como estágio sexual a forma *Albonectria rigidiuscula*, cujo peritécio varia a coloração de branco ao pálido, de forma subglobosa, globosa ou elipsóide. Os ascos contêm de 4 a 8 ascósporos de formato elipsóide, podendo ser longos e apresentar 3 septos (Leslie e Summerell, 2006).

2.2.2. O sistema *mating-type*

Os sistemas de acasalamento em fungos variam de simples aos mais complexos. A terminologia utilizada para descrever o sistema *mating-type* de acasalamento é baseada no número de *loci* genéticos e no número de alelos nestes *loci* envolvidos no processo. O sistema mais simples geneticamente é o encontrado na maior parte de espécies heterotáticas de ascomicetos, incluindo todas as espécies heterotáticas de *Fusarium*. Em *Fusarium*, há um simples *locus* denominado *MAT*, que tem dois alelos funcionais, *MAT-1* e *MAT-2*. Estes alelos são denominados “idiomorfos” e ocorrem na mesma posição relativa do cromossomo, não havendo similaridade nas suas sequências, podendo até mesmo apresentar tamanhos diferentes. Os termos mais comuns encontrados para definição do sistema de acasalamento em fungos são “homotático” e “heterotático”. Culturas homotáticas são culturas que produzem esporos sexuais a partir de uma cultura crescida de um único esporo (Blakeslee, 1904; Leslie e Summerel, 2006), enquanto que o ciclo de vida de espécies heterotáticas requer a interação entre dois indivíduos morfológicamente indistinguíveis, mas fisiologicamente distintos, crescidos de esporos separados. Uma das importantes diferenças fisiológicas entre indivíduos heterotáticos consiste exatamente na diferença de alelos *mating-type*. Indivíduos que portam diferentes alelos *mating-types* funcionais e que podem interagir para formarem o estágio sexual (como a formação de *Albonectria rigidiuscula* do anamorfo *Fusarium decemcellulare*) são denominados “compatíveis”. Indivíduos que compartilham todo ou parte de um alelo *mating-type* e que não podem interagir para formar o

estádio sexual são denominados “incompatíveis”. A maior parte das espécies em *Fusarium* são heterotáticas (Leslie e Summerell, 2006). Segundo Guimarães (2013), *Fusarium decemcellulare* consiste em um complexo filogenético formando clados distintos entre homotáticos e heterotáticos. Em cacaueiro (*Theobroma cacao*), existem registros de isolados homotáticos e heterotáticos, porém, apenas os heterotáticos são capazes de causar a doença (Reichle e Snyder, 1964). Em mangueira (*Mangifera indica*), os isolados responsáveis pela doença desencadeada também são heterotáticos (Guimarães, 2013).

2.2.3. Doenças e Hospedeiros

É geralmente encontrado em áreas tropicais e subtropicais e está associado com diversas patogenicidades em uma gama de hospedeiros (Leslie e Summerell, 2006). Em fruteira-do-conde, *F. decemcellulare* causa cancrose, onde observam-se áreas mais dilatadas em ramos mais desenvolvidos e no tronco, surgindo pequenas rachaduras sobre essas dilatações. Em cancos adiantados, observam-se casca e lenho escurecidos, a seiva não circula, causando a morte da planta (Junqueira *et al.*, 2001). Em limão-de-caiena os sintomas consistem no superbrotamento de inflorescências a partir do eixo floral, com inchamento e posterior secamento dos talos florais, com queda prematura de flores e frutos (Bastos e Santos, 2001). Em mangueira, são comuns relatos que descrevem a formação de galhas. Além deste sintoma, há ainda a proliferação excessiva de gemas que saem do ápice e axilas foliares com entrenós reduzidos e agrupados. Em plantas adultas o desenvolvimento de galhas continua, enfraquecendo a árvore e prejudicando a sua produção (Rondón *et al.*, 1983; Guimarães, 2013). Em cacau, causa a doença galha-floral ou buba-floral, consistindo em galhas e superbrotamento de gemas vegetativas e florais, a partir do crescimento meristemático tanto em ramos como no caule do cacaueiro (Vicente *et al.*, 2012). Além das doenças e hospedeiros mencionados, *F. decemcellulare* está também associado à podridão de raízes em plantio de erva-mate (Poletto *et al.*, 2006), sendo também o agente causal de cancrose em *Cedrelinga cateniformis* e *Calycophyllum spruceanum* (Lombard *et al.*, 2008; Brioso, 2012). Existem, ainda, recentes registros de *F. decemcellulare* associado à murcha de inflorescências e necrose vascular e floral em plantas de rambutã, longan e manga (Serrato-Diaz *et al.*, 2015), estando ainda associado ao superbrotamento de inflorescências em cajueiro (Matos *et al.*, 2016). Atualmente, representa uma das grandes ameaças à cultura do guaranazeiro no estado do

Amazonas, causando a doença denominada superbrotamento (Batista e Bolkan, 1982; Araújo *et al.*, 2006).

2.2.4. O superbrotamento em guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)

Em guaranazeiro, o primeiro relato de superbrotamento, atribuído a *F. decemcellulare*, foi no trabalho de Batista e Bolkan (1982). O superbrotamento consiste em uma das principais doenças em guaranazeiro, com crescente incidência nos municípios do estado do Amazonas, sendo grande responsável pela baixa produtividade da cultura no estado. As partes afetadas pela doença, devido à multiplicação exagerada de células, configuram-se em sítios de competição com estruturas sadias, prejudicando o desenvolvimento estrutural da planta e, por conseguinte, a produtividade. Os sintomas ocorrem em estruturas em desenvolvimento ativo, como ramos e inflorescências, e a planta os manifesta tanto em fase de muda, como em fase adulta, sendo possível prejudicar até 100% a produção de uma planta (Araújo *et al.*, 2006).

a) Superbrotamento de gemas: o fungo causa brotações sucessivas ao longo dos ramos, a partir de pontos muito próximos uns dos outros. A partir de uma gema pode resultar a proliferação de ramos vegetativos e/ou inflorescências (Figuras 1 e 2), sendo a proliferação de gemas vegetativas predominante no primeiro semestre do ano e a de inflorescências no segundo semestre. Os novos ramos apresentam entrenós mais curtos, dos quais há novos lançamentos de ramos secundários, dando origem a uma massa densa, semelhante à vassoura-de-bruxa do cacaueiro e do cupuaçuzeiro. Este quadro deve-se à multiplicação exagerada de células (hiperplasia) e também ao aumento de tamanho de parte das células (hipertrofia) com secamento precoce dos tecidos (Batista, 1983; Araújo *et al.*, 2006).



Figura 1. Superbrotamento de gemas vegetativas. **A:** visão geral de ramo infectado. **B:** visão ampliada de região com lançamentos de ramos secundários. **C:** visão ampliada – entrenós mais curtos.



Figura 2. Superbrotamento de inflorescências. **A:** visão geral de ramo com inflorescências infectado. **B:** visão ampliada.

b) Hipertrofia e hiperplasia floral: é possível também observar a ocorrência de hipertrofia e hiperplasia nas inflorescências (Figura 3). As flores adquirem aspecto mais compacto e endurecido, quando comparadas com inflorescências sadias (Figura 4), impedindo a polinização, com posterior e precoce secamento dos tecidos. Este sintoma ocorre no segundo semestre do ano, dependendo do estágio de desenvolvimento da planta (Araújo *et al.*, 2006).



Figura 3. Hipertrofia e hiperplasia das inflorescências. **A:** visão geral de inflorescência infectada. **B:** visão ampliada – flores compactas e endurecidas.



Figura 4. Inflorescências sadias.

c) Galhas do caule: consiste na proliferação de uma massa compacta e desorganizada em uma mesma gema (Figura 5). Podem ocorrer em gemas terminais de plantas jovens, ou em gemas sucessivas de ramos maduros de plantas mais desenvolvidas, ou ainda se distribuírem por toda a planta. Ocorre também o secamento precoce destas massas de brotações diminutas, sem formação de novos ramos a partir destas gemas (Araújo *et al.*, 2006).



A



B

Figura 5. Galhas do caule. **A:** visão geral de galha no caule. **B:** visão ampliada – massa compacta e desorganizada.

2.2.5. Estudos com *Fusarium decemcellulare*

Fusarium decemcellulare é reportado na literatura em diversos tipos de estudos, esteja o fungo na condição de endofítico ou de fitopatógeno. O fungo já foi reportado apresentando atividade antagônica com uma taxa de inibição maior que 80% contra 6 patógenos de importantes culturas (*Fusarium graminearum*, *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *F. oxysporum*, *Glomerella glycines* e *Phytophthora capsici*) (Liu *et al.*, 2010), além de apresentar atividade antagônica significativa também contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Aspergillus niger* (Singh e Thakur, 2014), em ensaios com extrato de lectina. Além das lectinas de *F. decemcellulare*, também foram focos de estudos a ação fitotóxica e síntese de naftoquinonas, bem como aspectos da atividade respiratória, estando o fungo em condições de estresse oxidativo e a sua adaptação nestas condições (Medentsev e Akimenko, 1992; Medentsev *et al.*, 2001; Medentsev *et al.*, 2002). Além destes estudos, *F. decemcellulare* é reportado ainda em trabalhos com identificação morfológica (Gerlach e Nirenberg, 1982; Leslie e Summerell, 2006), além de identificação do mesmo como agente causal de doenças em plantas como cacauzeiro (Vicente *et al.*, 2012), em mangueira (Qi *et al.*, 2013), em fruteira-do-conde (Junqueira *et al.*, 2001), em guaranazeiro (Araújo *et al.*, 2006), entre outros hospedeiros.

O presente trabalho é o primeiro estudo a abordar aspectos transcriptômicos de *F. decemcellulare*, havendo, inclusive, poucos trabalhos na literatura abordando aspectos genômicos. Nos últimos anos, marcadores moleculares em *F. decemcellulare* foram utilizados com sucesso para estudos de diversidade e identificação do fungo. Lobo *et al.* (2013) observaram diversidade genética de *F. decemcellulare* em um mesmo genótipo de guaranazeiro, bem como em genótipos diferentes, com as técnicas de BOX e ERIC-PCR. Silva *et al.* (2013), por meio da técnica de BOX-PCR, verificaram ocorrência de diversidade genética entre isolados de hiperplasia floral e galhas dentro de uma mesma planta. Os autores observaram ainda que isolados do sintoma de superbrotamento de gemas formaram um único grupo separado dos demais isolados dos outros sintomas. Silva *et al.* (2013b) confirmaram a eficiência do método de PCR-RFLP da região compreendida entre o final da subunidade 18S e o início da região 28S do DNA ribossomal para identificação de *F. decemcellulare*. Silva *et al.* (2013c), utilizando o marcador ISSR, observaram

a presença deste marcador em abundância no genoma de *F. decemcellulare*, sendo também possível o estudo de diversidade do fungo por esta técnica.

Os mais recentes relatos de análise filogenética do fungo são dos trabalhos de Sfalsin (2012) e Guimarães (2013), que apresentaram resultados relevantes no que diz respeito a inferências filogenéticas de isolados de *F. decemcellulare*, bem como a relação entre o tipo de reprodução sexuada e a patogenicidade. O primeiro relato de análise filogenética de *F. decemcellulare* associado a doenças em cacaueiro e outras espécies botânicas no Brasil, como mangueira, espatódea e pimenta-do-reino, é proveniente do trabalho de Sfalsin (2012). Sfalsin (2012) utilizou sequências parciais de *tefl* na análise filogenética e obteve como resultado isolados de *F. decemcellulare* formando um grupo monofilético com forte suporte estatístico (98% de *bootstrap*). Entretanto, sabidamente, apenas sequências parciais do gene *tefl* não forneceriam confiabilidade suficiente para afirmar *F. decemcellulare* como única espécie filogenética. No próprio trabalho foi observada separação em grupos monofiléticos, com forte suporte estatístico, de isolados de mangueira do México, isolados do Equador e da China. Além disso, foram levados em conta também indícios de separação entre isolados homotáticos e heterotáticos.

Esclarecendo a análise filogenética realizada por Sfalsin (2012), Guimarães (2013) realizou no seu estudo análises filogenéticas com base em sequências parciais dos genes *tef-1α*, *rpb2*, *ac11* e da região ITS-LSU. O trabalho contou com isolados de *F. decemcellulare* de diferentes hospedeiros: cacaueiro, mangueira, pimenta-do-reino, espatódea e guaranazeiro. Como conclusões, com base também nos demais testes realizados na pesquisa, Guimarães (2013) tem que isolados heterotáticos, causadores de galhas e superbrotamento em cacaueiro, pertencem a uma espécie filogenética e biológica distinta, enquanto que isolados homotáticos formam grupos distintos da espécie patogênica. Assim, *F. decemcellulare* representa um complexo de espécies que podem ser homotáticas e heterotáticas.

2.3. RNA-seq – a técnica aplicada a outros fitopatógenos

Há uma década, estudos de expressão gênica se restringiam ao âmbito da genética humana ou da genética de organismos-modelo. Nestes estudos, *microarrays* e outra série de ferramentas para análise de expressão de genes foram as únicas disponíveis para compreensão de características do perfil de transcritos e padrões globais de expressão. O rápido desenvolvimento dos

sequeenciadores de nova geração e a maturação de métodos analíticos dos dados gerados mudaram o cenário de estudos desta camada de informações biológicas situada entre o genótipo e o fenótipo: o transcriptoma (Wolf, 2013).

A tecnologia de sequenciamento do transcriptoma (RNA-seq) auxilia na quantificação da expressão através da contagem de *reads* de transcritos mapeados a uma região genômica. RNA-seq refere-se a tecnologias avançadas de sequenciamento para caracterizar o conteúdo de RNA e composição de dada amostra. Devido a limitações técnicas atualmente existentes, sequências de transcritos não podem ser obtidas por inteiras, sendo necessária uma decomposição aleatória dessas sequências em pequenos *reads* de até centenas de pares de bases. Na ausência do genoma previamente sequenciado ou informações prévias do transcriptoma, os transcritos precisam ser remontados a partir destes *reads*, a que se denomina “montagem *de novo*”. No caso de haver genoma sequenciado ou informações prévias do transcriptoma, *reads* podem ser alinhados diretamente contra a referência (Wolf, 2013; Rahmatallah *et al.*, 2014).

Análises de genoma e transcriptoma têm sido feitas em diversos fitopatógenos, com dados relevantes no que tange ao processo de infecção e suas particularidades moleculares. Thakur *et al.* (2013), por meio de sequenciamento e montagem *de novo* do transcriptoma de *Venturia inaequalis*, agente causal da sarna-da-maçã, identificaram importantes genes candidatos necessários à patogenicidade. Ke *et al.* (2014), traçando o perfil transcriptômico da interação *Valsa mali-maciei*ra, observou a importância de metabólitos secundários e hidrolases de parede celular durante o estabelecimento do cancro.

Recentemente, dados relevantes têm sido publicados para fungos do gênero *Colletotrichum*, como por exemplo, características moleculares da transição da condição biotrófica para necrotrófica em *Colletotrichum higginsianum* e *Colletotrichum graminicola* (O’Connell *et al.*, 2012). O’Connell *et al.* (2012) identificaram cinco categorias de genes importantes à patogenicidade de *C. higginsianum* (fatores de transcrição, enzimas do metabolismo secundário, proteínas candidatas a efetores secretados, enzimas ativadas por carboidratos e transportadores), com padrões de expressão diferentes durante a infecção. Os resultados levaram os autores, ainda, a redefinirem funções da estrutura apressório nestas espécies. A estrutura se mostrou, através do perfil transcriptômico nas primeiras etapas da infecção, altamente responsiva a estímulos da planta, percebidos antes da penetração. Assim, além da função de anexação e penetração, agrega-se ao apressório uma função sensorial, capacitando o fungo a se preparar para a subsequente invasão das

células vivas do hospedeiro. Schliebner *et al.* (2014) analisaram o transcriptoma de *Colletotrichum graminicola*, agente causal da antracnose no milho. Os autores fizeram uma revisão de modelos gênicos incorretos e ainda obtiveram informações preliminares de splicing alternativo em *C. graminicola*, assim, questionando a frequência e a relevância de splicing alternativo em fungos filamentosos. Alkan *et al.* (2015), analisando o transcriptoma de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose do tomate, detectaram sinais moleculares durante a fase de amadurecimento do fruto que foram responsáveis pela comutação do estado quiescente do fungo para o estado necrotrófico, o que aumenta a severidade da doença. O estado necrotrófico exibiu uma mudança significativa no metabolismo do fungo e aumento na expressão de fatores de patogenicidade. A resposta do fruto à necrotrofia mostrou a ativação da via do ácido salicílico, culminando na morte celular. Alguns dos trabalhos mais recentes envolvendo RNA-seq em análises com fitopatógenos são os trabalhos de Xu *et al.* (2016) e Liu *et al.* (2016). Xiu *et al.* (2016) constata a evolução do patógeno *Peltaster fructicola* de um fitopatógeno invasivo para um exofítico parasita em maçã, pêra e caqui, enquanto Liu *et al.* (2016) registram a descoberta de cinco novos micovírus (vírus de fungo) em *Cronartium ribicola*.

2.4. Homeostase de auxina em interações planta-patógeno.

Hoje, sabe-se que o hormônio auxina (sendo mais estudado o ácido indol-3-acético, AIA), além da regulação do crescimento e desenvolvimento da planta, está relacionado também com a causa de doenças, bem como com a resposta de defesa por parte do hospedeiro (Yang *et al.*, 2007; Kazan e Manners, 2009, González-Lamothe *et al.*, 2012). Bactérias, fungos, insetos, nematóides produzem ou modulam auxina durante a interação com hospedeiros. Entre algumas destas bactérias estão *Rhodococcus fascians*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter asburiae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium rubi*, *Pseudomonas gingeri*, *Pseudomonas rhizosphaerae*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Vasanthakumar e McManus, 2004; Vandeputte *et al.*, 2005; Chalupowicz *et al.*, 2006; Barash e Manulis-Sasson, 2009; Lee *et al.*, 2009). Entre os fungos que produzem auxina durante a interação se encontram *Tuber borchii*, *Tuber melanopsorum*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, *Pythium oligandrum*, *Pythium* grupo F, *Fusarium proliferatum*. (Chung *et al.*, 2003; Le Floch *et al.*, 2003; Maor *et al.*, 2004; Splivallo *et al.*, 2009; Tsavkelova *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2014). Entre alguns insetos estão vespas e psilídeos (Dorchin

et al., 2009; Straka *et al.*, 2011) e entre nematóides estão *Nacobbus aberrans* e *Meloidogyne incognita* (Vovlas *et al.*, 2007; Gisbert *et al.*, 2013). Anteriormente, acreditava-se que a via do indol-3-acetamida (IAM), dependente de triptofano, seria uma via de produção de AIA específica de bactérias, ao mesmo tempo que a via do ácido indol pirúvico (IPyA), também dependente de triptofano, seria a principal via de produção do hormônio em plantas. Estudos mais recentes mostram que enquanto bactérias como *Agrobacterium tumefaciens* e *Pantoea agglomerans* pvs. *gypsophilae* produzem AIA através da via do indol-3-acetamida (IAM) (Barash e Manulis-Sasson, 2009; Lee *et al.*, 2009), outras bactérias, como *Pseudomonas putida*, produzem AIA pela via do IPyA (Patten e Glick, 2002). Em fungos, *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* e *Colletotrichum acutatum* produzem o hormônio através das duas vias (Robinson *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 2003); *Fusarium delphinoides* se utiliza de três vias para a produção de AIA: via do IAM, via do IPyA e via da Triptamina (TRA) (Kulkarni *et al.*, 2013); e outras espécies de *Fusarium*, como *Fusarium proliferatum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium fujikuroi* e *Fusarium oxysporum*, também possuem a via do IAM, porém é completamente funcional apenas em *F. proliferatum* (Tsavkelova *et al.*, 2012).

À vista disso, o teor natural de auxina de determinado tecido, soma-se, ainda, à possível dose adicional de auxina produzida pelo agente externo. Em outras interações planta-patógeno, com surgimento de galhas e sintomas que partem aparentemente do princípio de multiplicação exagerada e desordenada de células, hipertrofia e hiperplasia celular, registra-se um desequilíbrio na concentração de auxina, creditando-se a este fator uma das possíveis causas dos sintomas (Lee *et al.*, 2009; Tooker e De Moraes, 2011; Yamagushi *et al.*, 2012; Bartlett e Connor, 2014; Teixeira *et al.*, 2014).

A quantidade de auxina ativa, uma vez fora de equilíbrio em determinado tecido, necessita ser regulada. Dentre as formas de regulação por parte da planta, destaca-se a sua conjugação a aminoácidos realizada por proteínas da família GH3 (Staswick *et al.*, 2005). Desta forma, a planta gera conjugados que funcionam como estoque de auxina e conjugados que ficam sujeitos a degradação. As formas AIA-Ala e AIA-Leu podem ser hidrolisadas por enzimas e fornecer novamente auxina ativa, enquanto que formas como AIA-Asp e AIA-Glu não são substratos para amino-hidrolases (Woodward e Bartel, 2005; Ludwig-Müller, 2011; González-Lamothe *et al.*, 2012). Segundo González-Lamothe *et al.* (2012), a forma AIA-Asp aumenta a suscetibilidade da planta a patógenos devido à contribuição deste conjugado à regulação da transcrição de genes de

virulência em fitopatógenos como *Botrytis cinerea* e *Pseudomonas syringae* em *Arabidopsis thaliana*. Assim, os autores classificam esta estratégia como um mecanismo de aumento de suscetibilidade da planta a patógenos por meio da conjugação de auxina efetuada por proteínas da família GH3. A Tabela 2 apresenta um levantamento recente de como a relação auxina-GH3 influencia outras interações planta-patógeno.

Tabela 2. Níveis de GH3 e conjugados de AIA em outras interações planta-patógeno. Adaptação do trabalho de Ludwig-Muller (2015).

Interação	GH3	AIA (conjugados)	Consequências (hospedeiro)
<i>Magnaporthe oryzae</i> – Arroz (Tanaka <i>et al.</i> , 2011)	Maior concentração	Maior concentração	Menor concentração de AIA livre, diminuição de expansinas, parede celular mais rígida, sem invasão do patógeno – MAIOR RESISTÊNCIA.
	Menor concentração	Menor concentração	Afrouxamento da parede celular, entrada do patógeno facilitada – MAIOR SUSCETIBILIDADE
<i>Botrytis cinerea</i> – <i>Arabidopsis thaliana</i> (González-Lamothe <i>et al.</i> , 2012)	Menor concentração	Menor concentração	MAIOR RESISTÊNCIA
	Maior concentração	Maior concentração (AIA-Asp)	Conjugado AIA-Asp induz genes de patogenicidade – MAIOR SUSCETIBILIDADE
<i>Plasmodiophora brassicae</i> –	Maior concentração	Maior concentração	?

<i>Arabidopsis thaliana</i> (Jahn <i>et al.</i> , 2013)	Menor concentração	Menor concentração	Galhas maiores – MAIOR SUSCETIBILIDADE
--	-----------------------	-----------------------	--

Desta forma, o presente trabalho levanta a hipótese de que *F. decemcellulare* produz auxina e esta dose a mais causa uma perturbação no equilíbrio hormonal durante a interação com o guaranazeiro. Esta perturbação pode interferir significativamente no controle de multiplicação, expansão e diferenciação celular, uma vez que a auxina contribui com tais processos celulares (Ludwig-Muller, 2015). Com isso, todo o processo de formação de estruturas celulares e de órgãos vê-se prejudicado e as anomalias seriam, portanto, os sintomas do superbrotamento, já descritos anteriormente. Levando em consideração que isolados heterotáticos são patogênicos e isolados homotáticos têm modo de vida endofítico ou saprofítico (Reichle e Snyder, 1964; Guimarães 2013), a hipótese aqui levantada é que os heterotáticos são capazes de produzir auxina e induzir os sintomas característicos em cada hospedeiro, diferente dos endofíticos ou saprofíticos, em culturas de mangueira e cacaueiro. Até o presente momento, não há comprovações de que, em guaranazeiro, *F. decemcellulare* tenha o mesmo comportamento quanto à reprodução, tampouco até que ponto este parâmetro pode influenciar na patogenicidade do fungo.

Diante do exposto, a análise do transcriptoma de *F. decemcellulare* ajuda a responder importantes questões ainda obscuras acerca do desencadeamento da doença. Os trabalhos com transcriptoma citados identificaram genes importantes à patogenicidade dos fitopatógenos, bem como deve se dar a defesa por parte do hospedeiro em termos moleculares, ou ainda, particularidades moleculares do hospedeiro que desencadeiam a doença. Logo, é de suma importância compreender os mecanismos que *F. decemcellulare* pode utilizar no processo de infecção e desenvolvimento da doença em guaranazeiro, no intuito de identificar formas de controle.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Analisar o transcriptoma de isolados homotáticos e heterotáticos de *Fusarium decemcellulare*.

3.2. Específicos

- ✓ Identificar genes de vias de biossíntese de auxina no transcriptoma de *Fusarium decemcellulare*.
- ✓ Analisar diferenças entre os perfis transcriptômicos de isolados homotáticos e heterotáticos crescidos nos meios de cultura BD e MS.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Condições de cultivo - RNA-seq

As amostras enviadas ao sequenciamento de RNA foram obtidas por meio do crescimento de isolados de *F. decemcellulare* (Tabela 3) em dois diferentes meios de cultura: o meio BD (Batata-Dextrose: 10 g de Dextrose, 250 g de batata e 1 L de H₂O) e o meio MS, enriquecido com triptofano (1 g de K₂HPO₄, 0,4 g de MgSO₄, 0,2 g de NaCl e 0,003 g de CuSO₄, triptofano a 1,5 mg mL⁻¹, glicose a 1,5 mg mL⁻¹, pH 7 e 1 L de H₂O) (Kulkarni *et al.*, 2013). Os isolados CML0038, CML0800 e CML2241 foram cedidos pelo Prof^o Dr. Ludwig Heinrich Pfenning, da Universidade Federal de Lavras.

Os isolados foram mantidos sob agitação constante de 180 rpm durante 15 dias, a 25 °C, para posterior extração do RNA total do micélio de cada isolado crescido nos meios de cultura acima descritos. Foram sequenciadas 12 bibliotecas, referentes a seis réplicas biológicas (três isolados homotáticos e três isolados heterotáticos) para cada condição (meio BD e MS).

Tabela 3. Isolados de *Fusarium decemcellulare* crescidos em meio BD e meio MS.

Código	Mating type	Hospedeiro/Substrato	Origem
CML0038	Homotático	Solo	Belém – PA
CML0800	Homotático	-	Marrocos
CML2241	Homotático	<i>Theobroma cacao</i> /Caule	Uruçuca – BA
FDC272	Heterotático (MAT-1)	<i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i> /HHF	Itapiranga – AM
FDC307	Heterotático (MAT-1)	<i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i> /HGV	Urucará – AM
FDC200	Heterotático (MAT-2)	<i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i> /HHF	Maués – AM

HHF: Hipertrofia e Hiperplasia floral; **HGV:** Superbrotamento de gemas vegetativas

4.2. Extração de RNA, preparo da biblioteca e sequenciamento

A extração do RNA total de *F. decemcellulare* foi realizada a partir dos isolados da Tabela 3 crescidos nos meios de cultura descritos anteriormente. No máximo, 100 mg do micélio foram macerados em nitrogênio líquido com o auxílio de almofariz e pistilo. Posteriormente, a extração prosseguiu conforme o kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), segundo recomendações do fabricante. As amostras foram tratadas ainda com RQ1 RNase-Free DNase (Promega), para remoção de contaminantes de DNA. Ao final, a integridade do RNA extraído foi visualizada em gel de agarose 1% e quantificado em QuBit (Invitrogen). A construção das bibliotecas de cDNA e sequenciamento foram realizados por prestação de serviços do Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), locado na Unicamp. Durante a construção das bibliotecas, foi utilizado o kit TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit (http://www.illumina.com/products/truseq_stranded_total_rna_library_prep_kit.html), seguido rigorosamente, conforme recomendações do fabricante, com etapa inicial de remoção de RNAr por meio de *beads* magnéticas. O sequenciamento do transcriptoma foi realizado através da plataforma Illumina, Next-Gen – HISEQ2500, seguindo os padrões: Preparação de Bibliotecas - RNA; Módulo RAPID – Paired End 2 x 150 pb; e cerca de 25 milhões de reads (3,75 Gb) por biblioteca.

4.3. Detecção de genes de vias de síntese de auxina – do controle de qualidade de *reads* à montagem do transcriptoma final e localização dos genes.

O genoma de referência utilizado no mapeamento de *reads* e montagem de transcritos foi o genoma do isolado FDC307 (Tabela 3). A montagem foi realizada combinando dados Illumina e PacBio, em parceria com o Laboratório Multiusuário de Bioinformática da Embrapa Informática Agropecuária e o Instituto Rothamsted Research (Inglaterra).

4.3.1. Controle de qualidade – Trimmomatic-0.33, FastQC e SortMeRNA.

O controle de qualidade das *reads* das 12 bibliotecas foi feito com as ferramentas Trimmomatic-0.33 (Bolger *et al.*, 2014) (Anexos – Box 1) e FastQC v0.11.3 (Andrews, 2010), para remoção de adaptadores e ruídos e visualização de qualidade de *reads*, respectivamente. Em seguida, foi utilizado o *software* SortMeRNA v.1.99 beta (Kopylova *et al.*, 2012) para quantificação de RNAr presente na amostra, remanescente mesmo após tratamento prévio durante preparação das bibliotecas, e sua posterior remoção.

4.3.2. Mapeamento de *reads* e montagem do transcriptoma final.

Primeiramente, o genoma de referência foi indexado através da ferramenta Bowtie2-build v.2.1.0 (Langmead e Salzberg, 2012). Em seguida, TopHat2 v2.0.9 (Kim *et al.*, 2013) foi utilizado para mapeamento de *reads* contra o genoma de referência. A montagem dos transcritos, do transcriptoma final e o cálculo de expressão diferencial foram feitos a partir do pacote Cufflinks v2.1.1 (Trapnell *et al.*, 2010), que inclui Cufflinks, Cuffmerge e Cuffdiff. Cufflinks e Cuffmerge foram usados para montagem de transcritos e do transcriptoma final, respectivamente, enquanto que Cufflinks e Cuffdiff foram utilizados para normalização e cálculo de expressão diferencial por FPKM (*fragments per kilobase per million mapped reads*) (Anexos – Box 2). Para o cálculo de expressão diferencial, foram feitas as seguintes comparações: Homotáticos x Heterotáticos (meio BD) e Homotáticos x Heterotáticos (meio MS).

4.3.3. Identificação de genes relacionados à via de biossíntese de auxina no genoma e transcriptoma final de *Fusarium decemcellulare*.

A busca por genes de vias de biossíntese de auxina no genoma de referência de *F. decemcellulare* foi realizada com auxílio da ferramenta BLAST, usando sequências de proteínas que codificam genes de diferentes vias de auxina, dependentes de triptofano, disponíveis no KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).

A análise da distribuição em cluster e orientação dos genes das vias mencionadas foi realizada com o auxílio do *software* Geneious 8.1.3 (<http://www.geneious.com/download>). Cada gene relacionado às vias de biossíntese de auxina foi localizado por cromossomo no genoma de *F.*

decemcellulare. A identificação de cluster foi realizada mediante identificação das regiões codificantes vizinhas ao genes de interesse.

Após obtenção dos transcriptomas finais do fungo nas condições BD e MS, foi realizado um novo BLAST, através da ferramenta Blastall 2.2.25 (Altschul *et al.*, 1997), das mesmas sequências de referência contra cada transcriptoma final obtido, através do algoritmo *blastx*. Para todos os procedimentos de BLAST, *matches* com $E\text{-value} \leq 1.0\text{E-}5$ foram considerados significativos.

4.3.4. Anotação Funcional

Os genes diferencialmente expressos, resultantes do cálculo realizado pelo Cuffdiff, foram anotados segundo termos do *gene ontology* (GO), utilizando o programa Blast2GO 3.3.5 (versão trial gratuita) (Götz *et al.*, 2008), que atribui termos do GO às sequências *query*, descrevendo processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares (<http://geneontology.org/>).

Os transcritos resultantes do BLAST com sequências de referência contra os transcriptomas finais foram, em seguida, anotados com o programa Blast2GO 3.3.5 (versão trial gratuita) (Götz *et al.*, 2008). Posteriormente, foi realizada a anotação das vias metabólicas através da ferramenta online KEGG *Automatic Annotation Server* (KAAS - <http://www.genome.jp/kegg/kaas/>).

4.4. Detecção de AIA secretado por *Fusarium decemcellulare*

A habilidade de *F. decemcellulare* na produção de auxina foi testada com os isolados FDC200 (heterotático) e CML2241 (homotático) (Tabela 3), depositados na Coleção Micológica da Embrapa Amazônia Ocidental (CPAA). Os isolados foram crescidos em 75 mL de meio MS, ao longo de 15 dias, a 180 rpm e 25 °C. Em seguida, os respectivos micélios foram removidos do meio de cultura por meio de filtragem com papel filtro, sendo aliqotados 50 mL do meio MS de cada frasco utilizado para o crescimento dos isolados, para posterior liofilização. As amostras de meio de cultura liofilizadas foram enviadas à Embrapa Agroindústria Tropical, onde foi realizada a detecção do hormônio presente em meio de cultura através de cromatografia líquida de ultra performance.

O método utilizado foi proposto pela primeira vez por Chiwocha *et al.* (2003) e modificado por Turecková *et al.* (2009). Foi usada uma versão adaptada do método de Turecková *et al.* (2009), onde 50 mg do meio de cultura liofilizado foram extraídos com 750 µL de uma solução metanol: água: ácido acético (10:89:1) durante uma hora, a 4 °C. O solvente foi subsequentemente removido com uma seringa e o material foi extraído novamente durante 30 minutos nas mesmas condições de extração inicial. Para evitar partículas, filtrou-se o extrato em membrana de PTFE 0,20 µm x 13 mm (Merck, Millipore, Ireland), sendo o filtrado, em seguida, submetido à extração em fase sólida (SPE) utilizando cartucho de C18 (100 mg, 3 mL, Phenomenex). Antes da introdução do extrato, o cartucho foi condicionado com 2 mL de metanol e equilibrado com 2 mL de uma solução de metanol: água: ácido acético (10:89:1). Aplicou-se então o extrato ao sistema de SPE, com posterior etapa de lavagem do cartucho com 1 mL de metanol: água: ácido acético (10:89:1), para remoção de interferentes. Em seguida, a solução foi eluída com 3 mL de metanol: água: ácido acético (10:89:1). O eluato foi seco sob um fluxo suave de nitrogênio e reconstituído com 300 µL de metanol: água (30:70), contendo ácido fórmico a 0,1%, filtrado através de uma membrana de PTFE 0,20 µm x 13 mm (Merck, Millipore, Ireland).

As análises foram realizadas pelo método *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC), acoplado a um analisador *Time-of-Flight* (TOF) *Waters Micromass* LCT espectrometria de massa, equipado com uma interface *electrospray* (ESI). As separações foram realizadas em coluna C18 (*Waters Acquity* UPLC C18, 150 milímetros × 2,1 milímetros, 1.7µm) e os perfis dos metabólitos nos extratos foram obtidos inicialmente por um gradiente exploratório, sendo as fases móveis H₂O (A) e acetonitrila (B), cada uma destas contendo ácido fórmico (0,1% v/v). As amostras foram submetidas a um gradiente exploratório de 5 – 95%, vazão de 500 µL min⁻¹. As análises de cada extrato foram realizadas em modo de ionização negativo (NI) no intervalo de 100 – 1200 Da, com o tempo de aquisição de 0,1 segundo no modo centróide. As condições ESI foram definidas da seguinte forma: tensão capilar 2800 V, tensão cone 40 V, temperatura da fonte 120 °C, temperatura de dessolvação 330 °C, fluxo de gás de cone de 20 L h⁻¹, fluxo de gás de dessolvação 600 L h⁻¹ e MCP (microcanais tensão da placa) – detector a 1900 V (Chiwocha *et al.*, 2003; Matsuda *et al.*, 2005).

5. RESULTADOS

O presente trabalho levanta a hipótese de que isolados heterotáticos de *F. decemcellulare* sejam capazes de sintetizar o hormônio auxina e esta dose a mais, durante a infecção, causa um desequilíbrio do teor do hormônio na planta. Esta perturbação pode interferir significativamente no controle de multiplicação, expansão e diferenciação celular, uma vez que a auxina desempenha estas funções fisiológicas (Ludwig-Muller, 2015). Os sintomas do superbrotamento em guaranazeiro seriam, então, anomalias resultantes deste descontrole no processo de formação de estruturas, podendo ser resultado até mesmo da tentativa da planta de reverter o equilíbrio hormonal a seu favor através das enzimas GH3 (seção 2.4). Logo, a busca por indicativos da capacidade de síntese de AIA por *F. decemcellulare* se inicia com a localização de possíveis genes componentes de vias de síntese do hormônio no genoma do fungo, seguindo posteriormente para a detecção de expressão destes genes, culminando, por fim, na verificação do produto final auxina em meio de cultura, como descrito a seguir.

5.1. Localização de genes de vias de síntese de auxina – nível genômico.

Foram localizados, no genoma de referência de *F. decemcellulare*, genes de putativas enzimas de duas vias de síntese do hormônio auxina na sua forma AIA (ácido indol-acético). Em uma das vias, os genes localizados correspondem a três possíveis enzimas que compõem a via de síntese de auxina a partir da conversão de indol-acetaldeído. Os dois primeiros passos, que consistem em putativas aminotransferase de aminoácidos aromáticos e piruvato descarboxilase, estão organizados em um cluster gênico situado no cromossomo 12, contando ainda com a presença de um fator de transcrição, que compartilha o mesmo promotor da piruvato descarboxilase (Figura 6). Ainda foi localizada como putativa aminotransferase de aminoácidos aromáticos uma enzima situada no cromossomo 3, portanto, sendo mais uma opção de passo 1 para a via do indol-acetaldeído (Figura 7). Para o terceiro e último passo da via, foram localizadas duas putativas indol-acetaldeído desidrogenases, ambas fora do cluster, sendo uma no cromossomo 9 (Figura 8) e a outra no cromossomo 2 (Figura 9).

Cromossomo 12 de FDC307

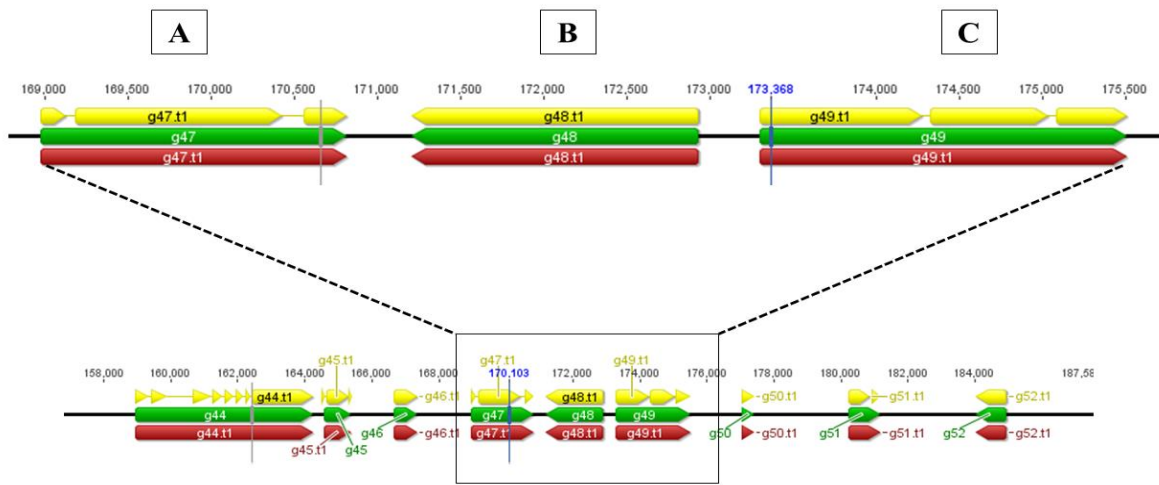


Figura 6. Cluster gênico contendo os dois putativos genes dos primeiros passos da via do indol-acetaldeído, localizado no cromossomo 12 do isolado FDC307 de *Fusarium decemcellulare*. **A:** Passo 1 da via do indol-acetaldeído – Putativa aminotransferase de aminoácidos aromáticos. **B:** Passo 2 da via do indol-acetaldeído – Putativa piruvato descarboxilase. **C:** Fator de transcrição Zn(II)2Cys6. A orientação das setas significa o sentido da transcrição. Setas amarelas representam as CDS (*Coding DNA sequence*) e os traços entre elas representam íntrons. As setas verdes representam o gene e as vermelhas o RNA mensageiro.

Cromossomo 3 de FDC307

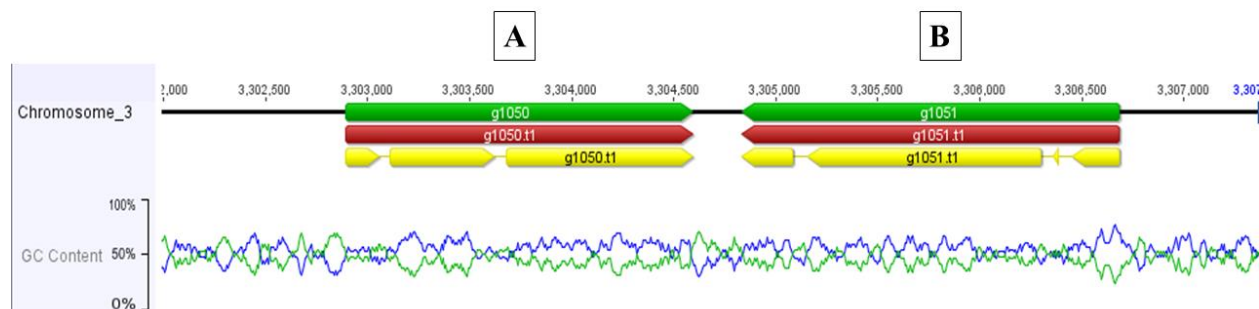


Figura 7. Putativo gene do passo 1 da via do indol-acetaldeído no cromossomo 3 do isolado FDC307 de *Fusarium decemcellulare*. **A:** Putativa citocromo P450. **B:** Passo 1 da via do indol-acetaldeído - Putativa aminotransferase de aminoácidos aromáticos. A orientação das setas significa o sentido da transcrição. Setas amarelas representam as CDS (*Coding DNA sequence*) e os traços entre elas representam íntrons. As setas verdes representam o gene e as vermelhas o RNA mensageiro.

Cromossomo 9 de FDC307

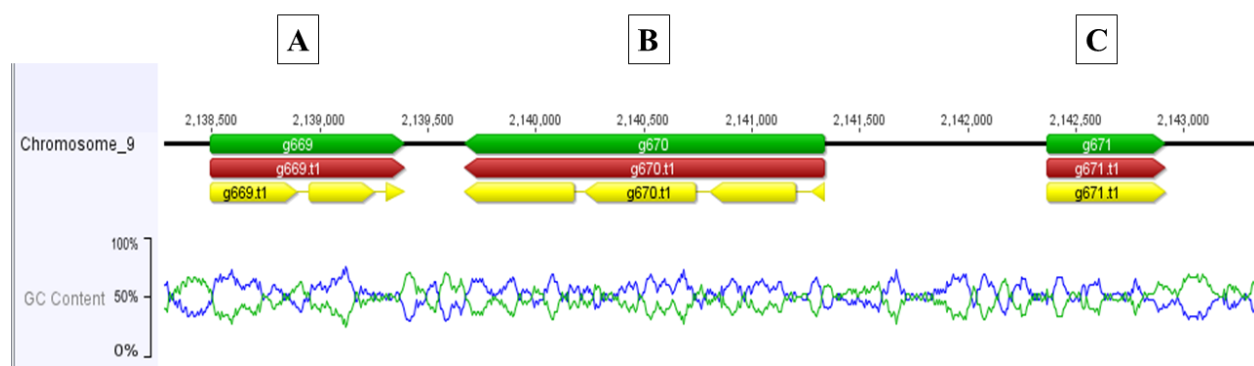


Figura 8. Putativo gene do passo 3 da via do indol-acetaldeído no cromossomo 9 do isolado FDC307 de *Fusarium decemcellulare*. **A:** Putativa 7-alfa-hidroxiesteroide desidrogenase. **B:** Passo 3 da via do indol-acetaldeído - Putativa indol-acetaldeído desidrogenase. **C:** Putativa proteína cis-3-ácido cloroacrilico. A orientação das setas significa o sentido da transcrição. Setas amarelas representam as CDS (*Coding DNA sequence*) e os traços entre elas representam íntrons. As setas verdes representam o gene e as vermelhas o RNA mensageiro

Cromossomo 2 de FDC307

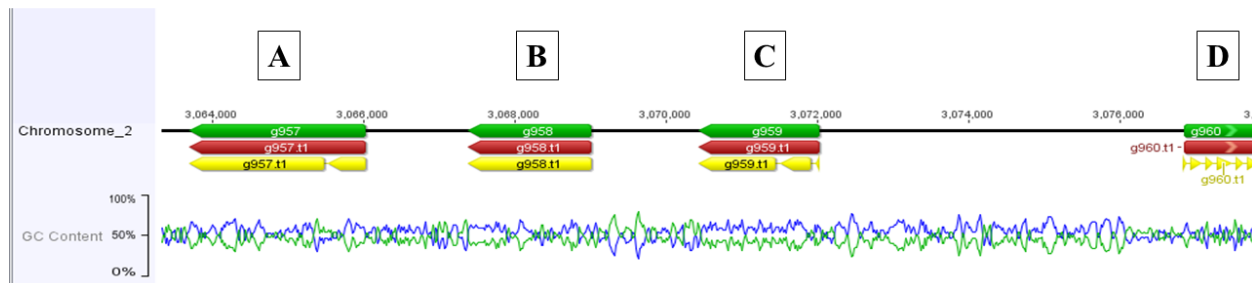


Figura 9. Putativo gene do passo 3 da via do indol-acetaldeído no cromossomo 2 do isolado FDC307 de *Fusarium decemcellulare*. **A:** Putativa proteína HSF (*heat shock factor*). **B:** Putativa peptidil-prolil isomerase CWC27. **C:** Passo 3 da via do indol-acetaldeído - Putativa indol-acetaldeído desidrogenase. **D:** Proteína hipotética. A orientação das setas significa o sentido da transcrição. Setas amarelas representam as CDS (*Coding DNA sequence*) e os traços entre elas representam íntrons. As setas verdes representam o gene e as vermelhas o RNA mensageiro.

Além da localização das possíveis enzimas constituintes da via do indol-acetaldeído, foi localizada ainda no genoma de referência de *F. decemcellulare*, no cromossomo 2, uma putativa proteína YUCCA. Esta enzima é componente de um desvio existente na via do indol-acetaldeído, que resulta também em AIA. (Figura 10).

Cromossomo 2 de FDC307

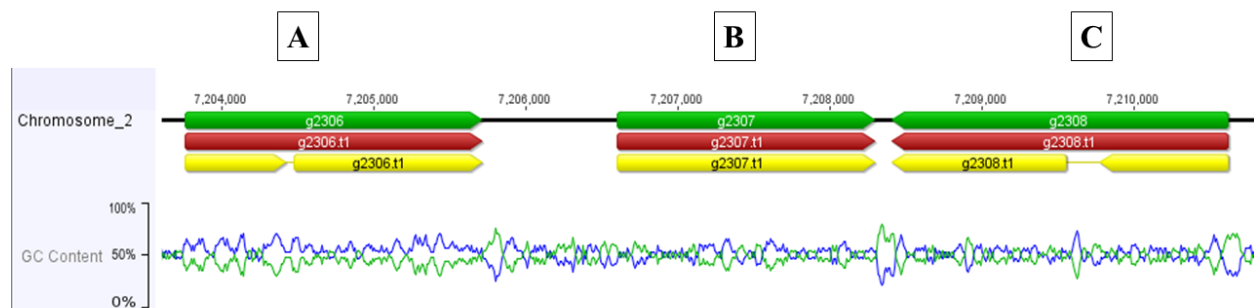


Figura 10. Putativa proteína YUCCA, componente do desvio da via do indol-acetaldeído, no cromossomo 2 do isolado FDC307 de *Fusarium decemcellulare*. **A:** Putativa proteína YUCCA (desvio da via do indol-acetaldeído). **B:** Putativa L-gulonolactona oxidase. **C:** Proteína hipotética. A orientação das setas significa o sentido da transcrição. Setas amarelas representam as CDS (*Coding DNA sequence*) e os traços entre elas representam íntrons. As setas verdes representam o gene e as vermelhas o RNA mensageiro.

A proteína YUCCA converte o indol-piruvato, resultante do primeiro passo da via, diretamente em AIA, sem precisar convertê-lo antes em indol-acetaldeído, como ocorre na atividade das putativas enzimas do cluster gênico do cromossomo 12.

Além da via do indol-acetaldeído e seu desvio, foram ainda localizadas duas proteínas correspondentes a prováveis descarboxilase de aminoácidos aromáticos (Figura 11) e amina oxidase (Figura 12) nos cromossomos 5 e 11, respectivamente. Estas enzimas compõem a via da triptamina, também encontrada no genoma de referência de *F. decemcellulare*, significando mais uma possível opção de biossíntese do hormônio auxina no fungo.

Cromossomo 5 de FDC307

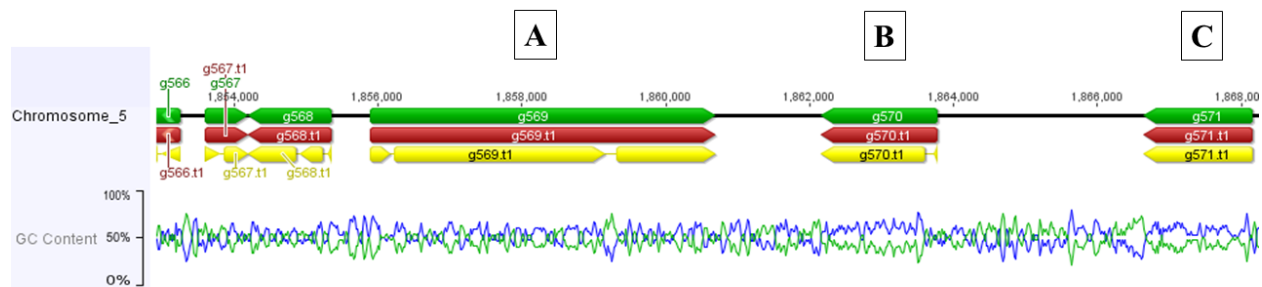


Figura 11. Putativo gene do passo 1 da via da triptamina, no cromossomo 5 do isolado FDC307 de *Fusarium decemcellulare*. **A:** Putativa lisofosfolipase NTE1. **B:** Passo 1 da via da triptamina - Putativa descarboxilase de aminoácidos aromáticos. **C:** Putativa proteína arrestina. A orientação das setas significa o sentido da transcrição. Setas amarelas representam as CDS (*Coding DNA sequence*) e os traços entre elas representam íntrons. As setas verdes representam o gene e as vermelhas o RNA mensageiro.

Cromossomo 11 de FDC307

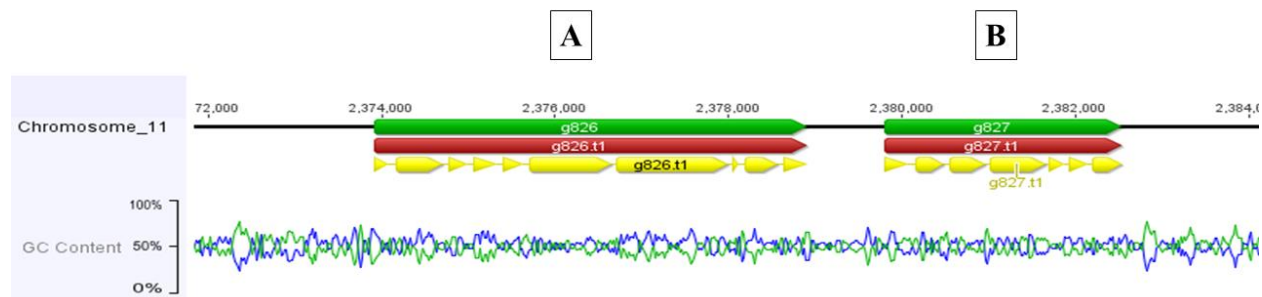


Figura 12. Putativo gene do passo 2 da via da triptamina, no cromossomo 11 do isolado FDC307 de *Fusarium decemcellulare*. **A:** Putativa proteína associada a resistência multidrogas 1. **B:** Passo 2 da via da triptamina - Putativa amina oxidase. A orientação das setas significa o sentido da transcrição. Setas amarelas representam as CDS (*Coding DNA sequence*) e os traços entre elas representam íntrons. As setas verdes representam o gene e as vermelhas o RNA mensageiro.

Assim, os genes localizados no genoma de *F. decemcellulare* sugerem a existência, a nível genômico, de pelo menos duas vias de síntese do hormônio auxina. A localização foi feita no genoma de referência do patógeno (isolado FDC307), consistindo nos primeiros indicativos de capacidade de síntese de auxina por parte de *F. decemcellulare*.

5.2. Sequenciamento, controle de qualidade e mapeamento de *reads*.

A detecção a nível transcriptômico dos putativos genes componentes de vias de síntese do hormônio auxina, bem como a observação dos perfis de expressão de indivíduos heterotáticos e homotáticos, foram realizadas por meio da construção de 12 bibliotecas de RNA-Seq, após 15 dias de crescimento nos meios de cultura BD e MS. Foram sequenciadas um total de 624.832.934 *reads*, com uma média de 151 pb de tamanho cada, das quais, após remoção de adaptadores e sequências de baixa qualidade, foi obtido um total de 471.959.447 *reads* (75,53%). Em seguida, fez-se necessário um novo tratamento para exclusão de sequências de RNAr remanescentes, totalizando 287.727.585 *reads* (46,04%), que foram, por fim, utilizadas no mapeamento contra o genoma de referência do isolado FDC307 (Tabela 4).

Tabela 4. Reads de RNA-seq provenientes de *Fusarium decemcellulare* crescido nos meios BD e MS, após 15 dias.

	Heterotáticos						Homotáticos						
	F272		F307		F200		CML0038		CML0800		CML2241		
	BD	MS	BD	MS	BD	MS	BD	MS	BD	MS	BD	MS	Total
Nº de reads	54733712	28179946	55338486	66508750	55723438	54009744	76984524	55217254	49975210	56909064	56719638	14533168	624832934 (100%)
Reads trimadas	42223345	19464583	40319673	52556413	42028966	37502279	63363818	44584678	37620886	40755680	41436541	10102585	471959447 (75,53%)
Reads sem rRNA residual	24393177	14301799	2484915	46921777	28458496	14690363	52150145	36561379	34372165	22576239	6472289	4344841	287727585 (46,04%)
Reads mapeadas	17330039	9377569	1921192	42946474	18421769	9149055	23280492	17550214	14556544	9395306	2490077	1734474	168153205 (26,91%)

5.3. Detecção de genes de vias de síntese de auxina – nível transcriptômico.

Após o BLAST das sequências de referência nos transcriptomas finais de cada condição, foi possível identificar em *F. decemcellulare* todas as putativas enzimas que compõem as duas vias de síntese do hormônio auxina previamente localizadas a nível genômico (seção 5.1). A partir das anotações feitas pela ferramenta online KAAS e pelo *software* Blast2GO, foram atribuídos *EC numbers* e termos GO a estes transcritos candidatos. Sendo assim, portanto, a categorização destas enzimas enquadra-as funcionalmente, de fato, nas vias do indol-acetaldeído e da triptamina (Figura 13).

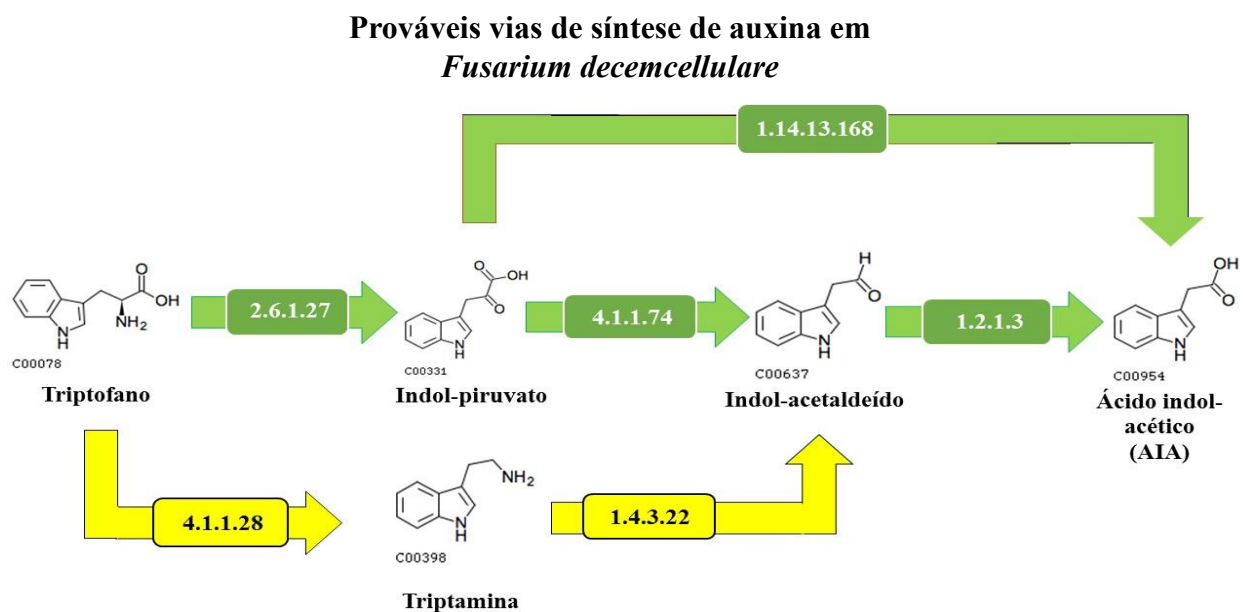


Figura 13. Duas prováveis vias de síntese de auxina em *Fusarium decemcellulare*. ■ Via do indol-acetaldeído ■ Via da triptamina. **1.14.13.168:** Monooxigenase YUCCA. **2.6.1.27:** Aminotransferase de aminoácidos aromáticos. **4.1.1.74:** Piruvato descarboxilase. **1.2.1.3:** Indol-acetaldeído desidrogenase. **4.1.1.28:** Descarboxilase de aminoácidos aromáticos. **1.4.3.22:** Amina oxidase. Estruturas químicas com base no banco de dados KEGG.

A anotação funcional das sequências candidatas, após detecção das mesmas a nível genômico e transcriptômico, reforça a possibilidade de se tratarem de enzimas componentes de vias de síntese de AIA. Sendo assim, *F. decemcellulare* seria capaz de produzir o hormônio auxina, na sua forma AIA, a partir do aminoácido triptofano, seguindo pelo menos duas vias diferentes. Vale ressaltar ainda que dentro de uma destas vias, a via do indol-acetaldeído, existe um desvio da rota partindo do precursor indol-piruvato, envolvendo a enzima monooxigenase YUCCA, consistindo em mais um possível caminho para a síntese de auxina. Foi observado, no entanto, que as seis réplicas de *F. decemcellulare* utilizadas não se portam da mesma maneira em termos do que expressam e em qual meio de cultura expressam (Tabela 5).

Tabela 5. Detecção de transcritos dos passos relacionados às prováveis vias de síntese de auxina em diferentes isolados de *Fusarium decemcellulare*.

VIA	ENZIMA/EC number	LOCO	ISOLADOS	
Indol-acetaldeído	Aminotransferase de aminoácidos aromáticos (Passo 1) / 2.6.1.27	Chr 12: 962209-964149	<input type="checkbox"/> FDC200 <input type="checkbox"/> FDC272 <input checked="" type="checkbox"/> FDC307	<input type="checkbox"/> CML0038 <input checked="" type="checkbox"/> CML0800 <input checked="" type="checkbox"/> CML2241
Indol-acetaldeído	Aminotransferase de aminoácidos aromáticos (Passo 1) / 2.6.1.27	Chr 3: 3303688-3306909	<input checked="" type="checkbox"/> FDC200 <input checked="" type="checkbox"/> FDC272 <input checked="" type="checkbox"/> FDC307	<input checked="" type="checkbox"/> CML0038 <input checked="" type="checkbox"/> CML0800 <input checked="" type="checkbox"/> CML2241
Indol-acetaldeído	Piruvato descarboxilase (Passo 2) / 4.1.1.74	Chr 12: 964538-966472	<input type="checkbox"/> FDC200 <input type="checkbox"/> FDC272 <input checked="" type="checkbox"/> FDC307	<input checked="" type="checkbox"/> CML0038 <input checked="" type="checkbox"/> CML0800 <input checked="" type="checkbox"/> CML2241
Indol-acetaldeído	Fator de transcrição Zn(II)2Cys6	Chr 12: 966699-969043	<input checked="" type="checkbox"/> FDC200 ^a <input checked="" type="checkbox"/> FDC272 <input checked="" type="checkbox"/> FDC307	<input checked="" type="checkbox"/> CML0038 <input checked="" type="checkbox"/> CML0800 <input checked="" type="checkbox"/> CML2241 ^a
Indol-acetaldeído	Indol-acetaldeído desidrogenase (Passo 3) / 1.2.1.3	Chr 9: 2139607-2141291	<input checked="" type="checkbox"/> FDC200 <input checked="" type="checkbox"/> FDC272 <input checked="" type="checkbox"/> FDC307	<input checked="" type="checkbox"/> CML0038 <input checked="" type="checkbox"/> CML0800 <input checked="" type="checkbox"/> CML2241
Indol-acetaldeído	Indol-acetaldeído desidrogenase (Passo 3) / 1.2.1.3	Chr 2: 3070292-3072212	<input checked="" type="checkbox"/> FDC200 <input checked="" type="checkbox"/> FDC272 <input checked="" type="checkbox"/> FDC307	<input checked="" type="checkbox"/> CML0038 <input checked="" type="checkbox"/> CML0800 <input checked="" type="checkbox"/> CML2241

Continua

Indol-acetaldeído (desvio)	Monooxygenase YUCCA / 1.14.13.168	Chr 2: 7203674-7205803	<input checked="" type="checkbox"/> FDC200 <input checked="" type="checkbox"/> FDC272 <input checked="" type="checkbox"/> FDC307	<input checked="" type="checkbox"/> CML0038 <input checked="" type="checkbox"/> CML0800 <input checked="" type="checkbox"/> CML2241
Triptamina	Descarboxilase de aminoácidos aromáticos (Passo 1) / 4.1.1.28	Chr 5: 1859440-1864159	<input checked="" type="checkbox"/> FDC200 <input checked="" type="checkbox"/> FDC272 <input checked="" type="checkbox"/> FDC307	<input checked="" type="checkbox"/> CML0038 <input checked="" type="checkbox"/> CML0800 <input checked="" type="checkbox"/> CML2241
Triptamina	Amina oxidase (Passo 2) / 1.4.3.22	Chr 11: 2379836-2382831	<input checked="" type="checkbox"/> FDC200 <input checked="" type="checkbox"/> FDC272 <input checked="" type="checkbox"/> FDC307	<input checked="" type="checkbox"/> CML0038 <input checked="" type="checkbox"/> CML0800 <input checked="" type="checkbox"/> CML2241

^a Apenas um transcrito, dos três que compõem o fator de transcrição, foi expresso.

Chr: cromossomo.

☒ Expresso em meio BD e em meio MS.

☒ Expresso somente em meio BD.

☒ Expresso somente em meio MS.

Via do indol-acetaldeído: na via do indol-acetaldeído, o aminoácido triptofano é convertido em indol-piruvato pela ação da aminotransferase de aminoácidos aromáticos (*EC number*: 2.6.1.27). Em seguida, o indol-piruvato é convertido em indol-acetaldeído, pela ação da indol-piruvato descarboxilase (*EC number*: 4.1.1.74), para finalmente ser convertido em ácido indol-acético (AIA) pela indol-acetaldeído desidrogenase (*EC number*: 1.2.1.3) (Figura 14).

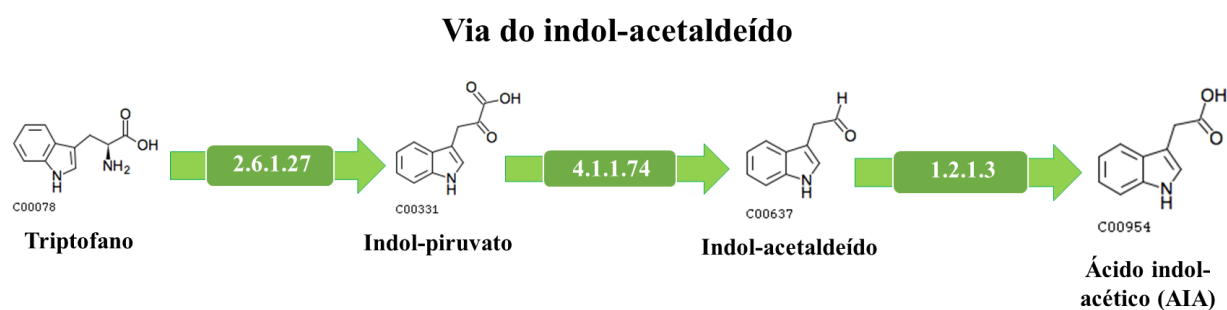


Figura 14. Via do indol-acetaldeído. **2.6.1.27:** Aminotransferase de aminoácidos aromáticos. **4.1.1.74:** Piruvato descarboxilase. **1.2.1.3:** Indol-acetaldeído desidrogenase. Estruturas químicas com base no banco de dados KEGG.

A Tabela 5 mostra que, com relação ao cluster gênico contendo os dois primeiros passos da via do indol-acetaldeído (*EC numbers*: 2.1.6.27 e 4.1.1.74), existe expressão somente no meio MS por parte de apenas um heterotático (FDC307) e três homotáticos (CML0800, CML2241 e CML0038, sendo que este último somente expressa o passo 2). Completando a via, observa-se ainda a expressão de dois genes identificados como possíveis indol-acetaldeído desidrogenases, o terceiro passo (*Ec number*: 1.2.1.3): um estando presente no cromossomo 9 e o outro no cromossomo 2, sendo este último expresso por todos os isolados, nos dois meios de cultura. Este cenário propõe, portanto, que a síntese de auxina pela via do indol-acetaldeído, fazendo-se uso dos componentes do cluster gênico do cromossomo 12, somente estaria sendo utilizada pelos isolados FDC307, CML0800 e CML2241, uma vez que CML0038 expressa somente o passo 2. Observa-se também que os genes pertencentes ao cluster (passos 1 e 2 da via) são somente expressos no meio de cultura MS, condição em que *F. decemcellulare* cresceu suplementado pelo aminoácido triptofano.

Desvio da via do indol-acetaldeído: no desvio da via do indol-acetaldeído, o indol-piruvato resultante da atividade da aminotransferase de aminoácidos aromáticos (*EC number*: 2.6.1.27) é convertido diretamente em AIA, pela monooxigenase YUCCA (*EC number*: 1.14.13.168) (Figura 15).

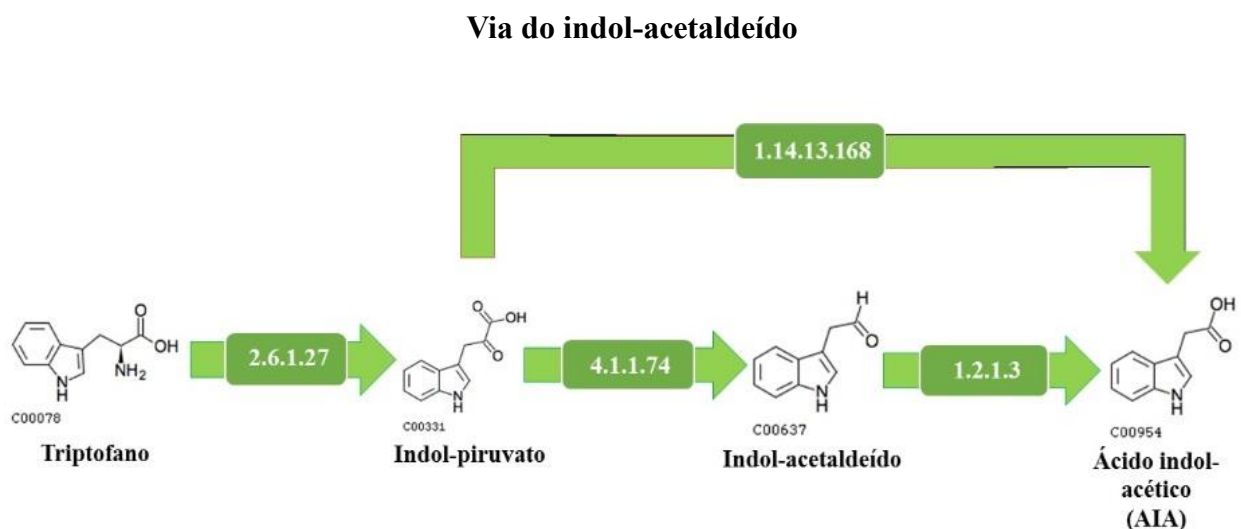


Figura 15. Desvio da via do indol-acetaldeído. **1.14.13.168:** Monooxigenase YUCCA. **2.6.1.27:** Aminotransferase de aminoácidos aromáticos. **4.1.1.74:** Piruvato descarboxilase. **1.2.1.3:** Indol-acetaldeído desidrogenase. Estruturas químicas com base no KEGG.

É possível observar ainda que existe um gene, localizado no cromossomo 3, identificado como putativa aminotransferase de aminoácidos aromáticos, o passo 1 da via do indol-acetaldeído (*EC number*: 2.1.6.27). Este, por sua vez, é expresso por todos os isolados, nos dois meios de cultura avaliados, exceto no que se refere ao isolado homotático CML2241, que somente expressa este gene na condição MS. Com a expressão por parte de todos os isolados desta putativa aminotransferase no passo 1 da via, torna-se possível um caminho diferente até o AIA: o desvio da rota, partindo do precursor indol-piruvato via monooxigenase YUCCA (*EC number*: 1.14.13.168), com destino ao produto final - o hormônio auxina. O gene da monooxigenase YUCCA é expresso por todos os isolados, nos dois meios de cultura, sugerindo, portanto, o uso do desvio da rota do indol-acetaldeído, via YUCCA, para síntese de AIA.

Via da triptamina: na via da triptamina, o precursor triptofano é convertido em triptamina pela ação da enzima descarboxilase de aminoácidos aromáticos (*EC number*: 4.1.1.28). Em seguida, a triptamina é convertida em indol-acetaldeído pela amina oxidase, sendo posteriormente convertido em AIA pela indol-acetaldeído desidrogenase (*EC number*: 1.2.1.3) (Figura 16).

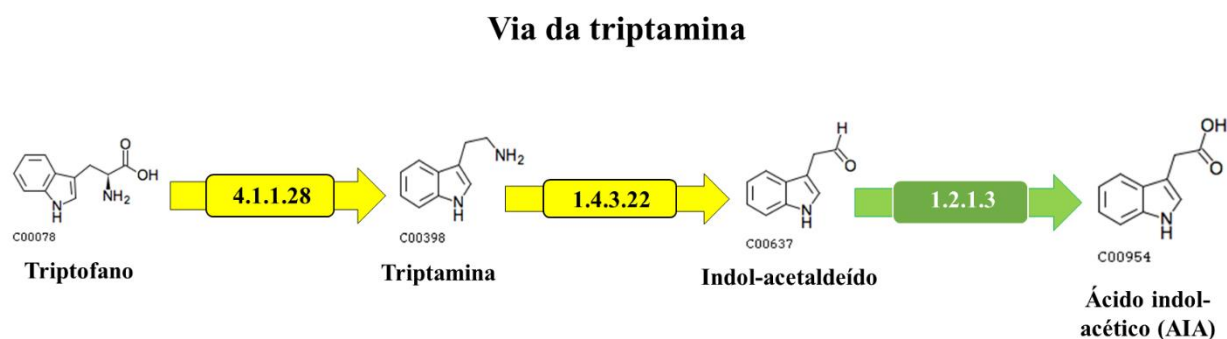


Figura 16. Via da triptamina. **4.1.1.28:** Descarboxilase de aminoácidos aromáticos. **1.4.3.22:** Amina oxidase. **1.2.1.3:** Indol-acetaldeído desidrogenase. Estruturas químicas com base no KEGG.

Como já mencionado, a Tabela 5 mostra que dois genes, que correspondem ao terceiro passo da via do indol-acetaldeído (*Ec number*: 1.2.1.3), são expressos. A expressão desta putativa indol-acetaldeído desidrogenase, sobretudo o gene presente no cromossomo 2 (expresso por todos os

isolados) funciona também como terceiro passo da provável segunda via de síntese do hormônio auxina, detectada no transcriptoma e no genoma de *F. decemcellulare*: a via da triptamina. Foi observado que há expressão dos dois primeiros passos desta via (*Ec numbers*: 4.1.1.28 e 1.4.3.22), sendo o gene do primeiro passo identificado como uma putativa descarboxilase de aminoácidos aromáticos, expresso por todos os isolados. O gene do segundo passo da via, identificado como provável amina oxidase, também é expresso por todos os isolados, nos dois meios de cultura. Logo, esta configuração sugere utilização de mais uma via de síntese do hormônio auxina pelo fungo *F. decemcellulare*.

Feitas as devidas considerações, sobre quais isolados expressam quais genes de quais vias, é possível observar que não existe um padrão de expressão diferenciando heterotáticos de homotáticos (Figura 17). Quanto aos meios de cultura, a única influência notada foi que os genes do cluster gênico (via do indol-acetaldeído) somente foram expressos no meio MS (suplementado com triptofano). Os demais genes detectados foram expressos em ambos os meios de cultura. Observa-se, então, que as diferenças no que tange às vias utilizadas para a síntese do hormônio começam a surgir já no nível de indivíduo para indivíduo, como resume a Tabela 6.

Tabela 6. Vias de síntese do hormônio auxina utilizadas por *Fusarium decemcellulare* crescido nos meios de cultura BD e MS.

	HETEROTÁLICOS						HOMOTÁLICOS					
	FDC272		FDC307		FDC200		CML0038		CML0800		CML2241	
VIAS	BD	MS	BD	MS	BD	MS	BD	MS	BD	MS	BD	MS
Indol-acetaldeído				✓						✓		✓
Desvio da via do indol-acetaldeído (YUCCA)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
Triptamina	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓

Nota-se, portanto, que existe expressão de genes componentes de vias de síntese de auxina tanto por parte de indivíduos heterotáticos, quanto por indivíduos homotáticos. Uma vez que *F. decemcellulare* está diretamente relacionado com a causa dos sintomas do superbrotamento, os dados até aqui apresentados constituem mais um indicador de que o fungo é capaz de desencadear a doença, tendo como uma das prováveis táticas a síntese do hormônio auxina. O desenho experimental utilizado por este trabalho levou em conta os relatos publicados sobre a ocorrência da doença em cacaueiro e mangueira (Reichle e Snyder, 1964; Guimarães 2013), por parte de isolados somente heterotáticos e não homotáticos. Assim, contrariando o esperado dos resultados aqui obtidos, tanto heterotáticos quanto homotáticos expressam genes de síntese de auxina. Ainda não existem registros de indivíduos homotáticos provenientes da cultura do guaranazeiro. Atribui-se, portanto, a causa da doença na cultura apenas aos indivíduos heterotáticos, até então. Vale ressaltar, entretanto, que no que se trata da habilidade de sintetizar o hormônio, os dois tipos sexuais são apontados pelos dados aqui apresentados como possíveis produtores de auxina.

5.4. Genes diferencialmente expressos

Considerando somente os genes com $p\text{-value} \leq 0.05$, foi identificado um total 1649 genes diferencialmente expressos por heterotáticos e homotáticos em BD e 1466 genes diferencialmente expressos pelos mesmos em MS. Em BD, 1094 genes foram mais expressos por heterotáticos e 555 genes mais expressos por homotáticos, enquanto que em MS, 1223 genes foram mais expressos por heterotáticos e 243 genes mais expressos por homotáticos (Figura 18).

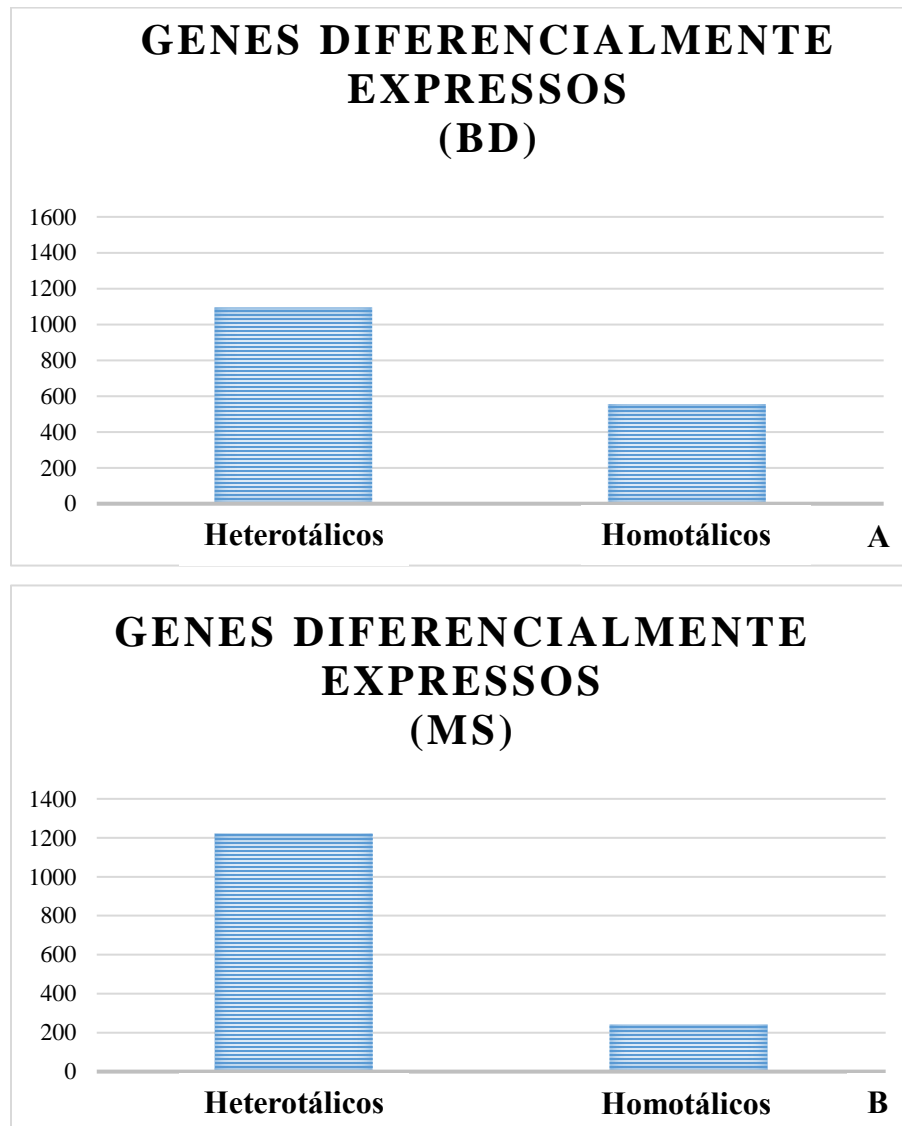


Figura 18. Comparação do número de genes diferencialmente expressos identificados em isolados heterotáticos e homotáticos de *Fusarium decemcellulare* crescidos em BD (A) e MS (B). No eixo Y de A, escala representando o total de 1649 genes diferencialmente expressos em BD. No eixo Y de B, escala representando o total de 1466 genes diferencialmente expressos em MS.

O banco de dados GO, utilizado para categorizar funções dos genes diferencialmente expressos, classificou os genes mais expressos por heterotáticos e homotáticos, em BD e MS, após 15 dias de crescimento nestes meios de cultura. As Figuras 19 e 20 apresentam o top 50 de termos GO associados a genes mais expressos por heterotáticos e homotáticos em meio BD e em meio MS, respectivamente.

O conjunto de genes mais expressos no meio de cultura BD (Figura 19) mostra que, no aspecto Processos Biológicos, a categoria *Cellular component organization or biogenesis* é somente observada no top 50 de homotáticos. Este grupo de genes está representado por proteínas como GRC3 (polinucleotídeo-5-hidroxil-quinase), MSH6 (proteína de reparo do DNA) e NDC80 (proteína do cinetocoro). Ainda em BD, observa-se no aspecto Componentes Celulares, a categoria *Organelle part* sendo constatada também apenas em homotáticos. Este grupo de genes está representado por, além das proteínas da categoria *Cellular component organization or biogenesis* supracitadas, proteína ALP6 (proteína componente do centro de organização de microtúbulos), por proteínas promotoras da anáfase e envolvidas na divisão celular, em geral. O conjunto de genes mais expressos no meio de cultura MS (Figura 20) mostra que, no aspecto Processos Biológicos, a categoria *Response to stimulus* é somente observada no top 50 de homotáticos. Este grupo de genes está representado por proteínas como HSP98 (*heat shock protein*), proteína reguladora de sensibilidade a drogas e proteínas de resposta a etanol. No aspecto Função Molecular, observa-se as categorias *Nucleic acid binding transcription factor activity* e *Transporter activity* figurando no top 50 somente de heterotáticos. Estes grupos de genes são representados pelo ativador transcricional ARO80, proteína *c6 finger*, proteínas transportadoras ativas de ureia e de açúcares. No aspecto Componentes Celulares, as categorias *Membrane-enclosed lumen*, *Macromolecular complex* e *Organelle part* figuram no top 50 de somente indivíduos homotáticos. Este grupo de genes está representado por uma isocitrato liase, proteínas transportadoras de ácidos graxos, proteína de controle de divisão celular e pela proteína midasina.

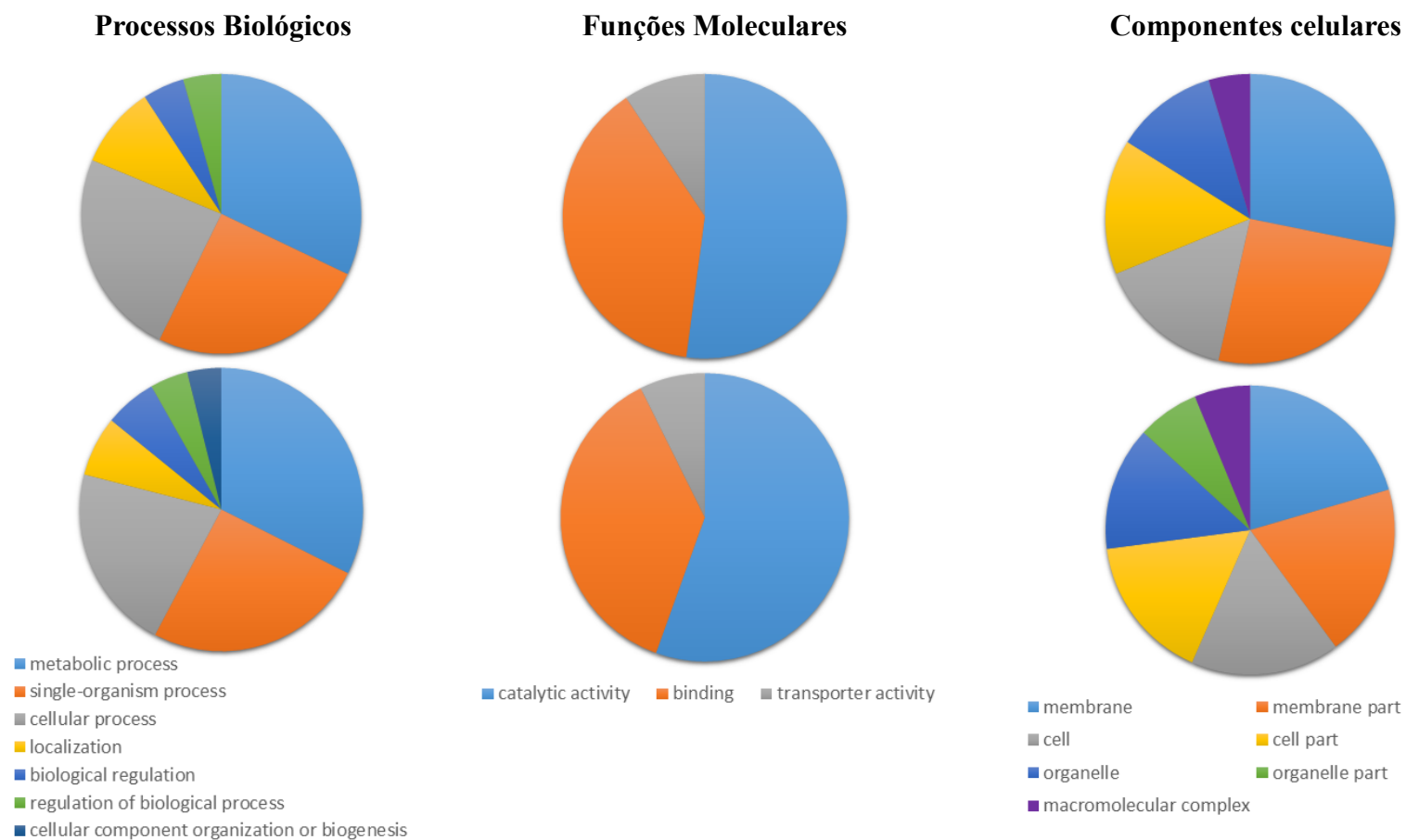


Figura 19. Termos GO (top 50) associados a genes mais expressos em heterotáticos (em cima) e homotáticos (embaixo) na condição BD.

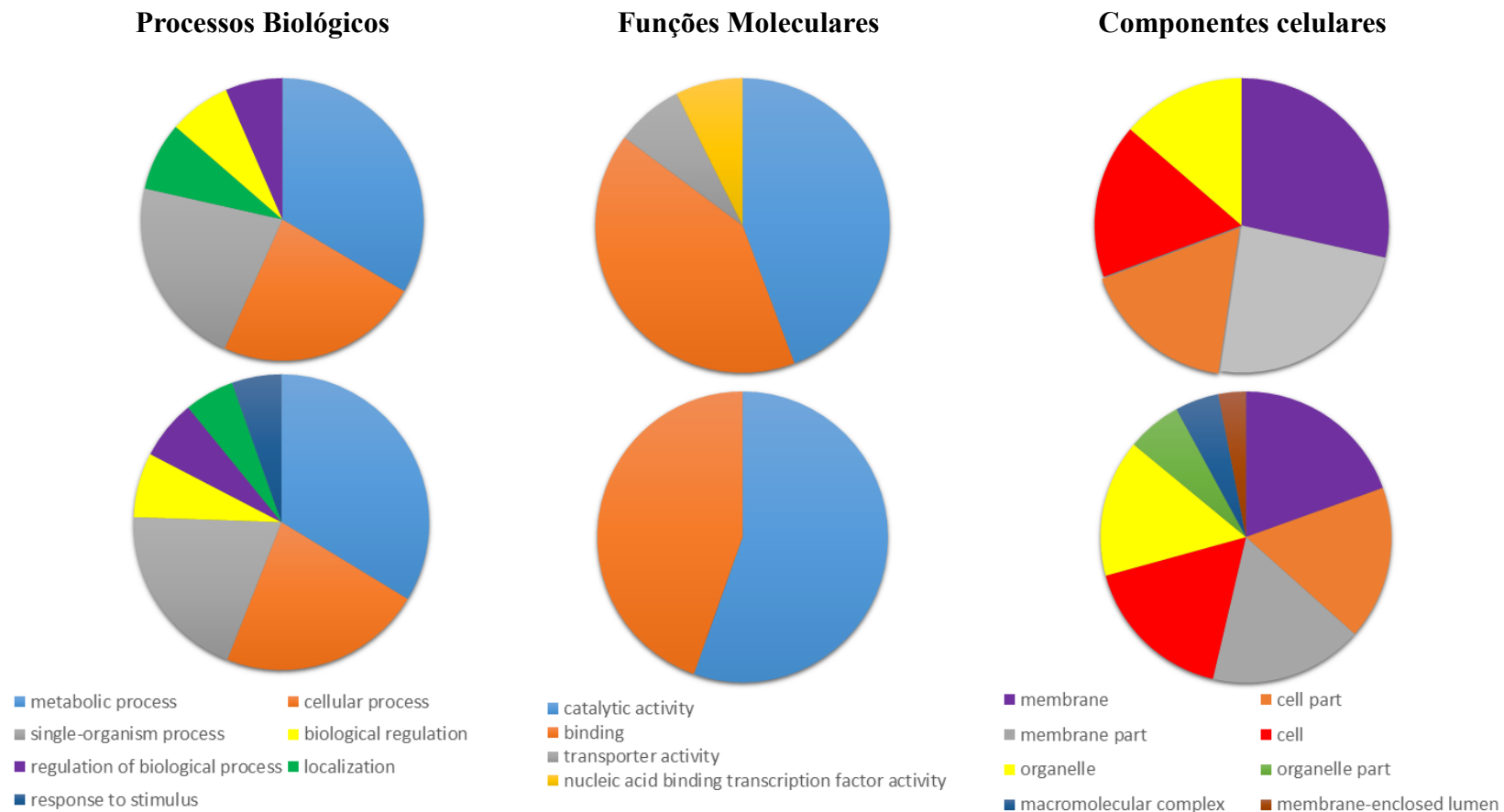


Figura 20. Termos GO (top 50) associados a genes mais expressos em heterotáticos (em cima) e homotáticos (embaixo) na condição MS.

5.5. Detecção de AIA secretado por *Fusarium decemcellulare*

Para confirmar se *F. decemcellulare* é capaz de produzir AIA em meio de cultura, foi realizada a análise por UPLC-ESI-TOF-MS tendo como amostra o meio de cultura MS, onde os isolados FDC200 (heterotático) e CML2241 (homotático) foram crescidos nas condições já descritas. O padrão analítico de AIA foi utilizado para a confirmação inequívoca da presença do hormônio.

A Figura 21 apresenta o cromatograma em modo *negative-ion Full Scan* (m/z 120 – 1180 Da) e cromatogramas de íons extraídos (m/z 174.05 Da), referentes ao padrão analítico de AIA e às amostras de meio de cultura onde foram crescidos os isolados FDC200 e CML2241. O padrão analítico apresentou tempo de retenção de 5,30 minutos e íon precursor m/z 174.0561 [M-H], condizente com a fórmula molecular do AIA ($C_{10}H_9NO_2$), apresentando erro menor que 5 ppm. A fragmentação do íon precursor de m/z 174.0549 sugeriu a perda neutra de CO_2 (-44 Da) e formação de um íon produto de m/z 130.0662. A comparação entre as amostras do meio de cultura onde cresceram os isolados e o padrão analítico demonstram que há concordância entre os tempos de retenção (Figura 21) e espectros de massas de alta resolução (Figura 22), tanto para a amostra proveniente do crescimento de FDC200, quanto para a amostra proveniente de CML2241. As amostras apresentaram os mesmos tempos de retenção em 5,30 minutos, as mesmas fórmulas moleculares $C_{10}H_9NO_2$, com erros menores que 5 ppm. Os íons fragmentos encontrados em ambas as amostras são coerentes com o mecanismo de fragmentação do padrão analítico e com dados da literatura, notando-se a partir do íon precursor m/z 174.0546 formação de um íon produto com m/z 130.0657 [M-H- CO_2]⁻ (Chiwocha *et al.*, 2003; Matsuda *et al.*, 2005).

Os dados cromatográficos e espectrométricos do padrão analítico comparados aos dados das amostras dos isolados FDC200 e CML2241 confirmam presença de AIA no meio de cultura MS e sugerem produção do hormônio por parte dos isolados heterotático e homotático testados.

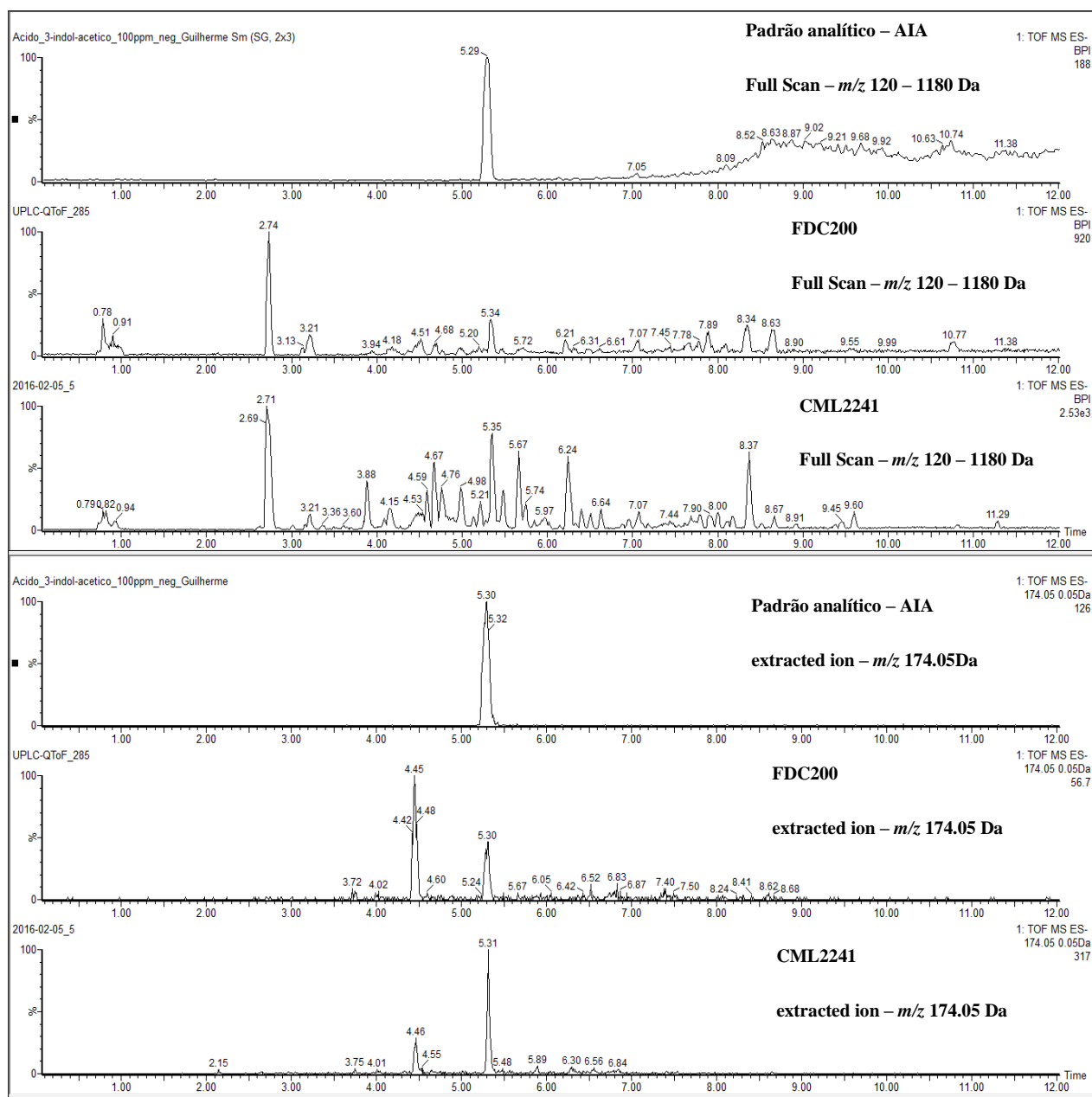


Figura 21. Concordância entre os tempos de retenção (5,3 minutos) do padrão analítico – AIA e das amostras provenientes do crescimento de *Fusarium decemcellulare* em meio de cultura MS (FDC200 e CML2241).

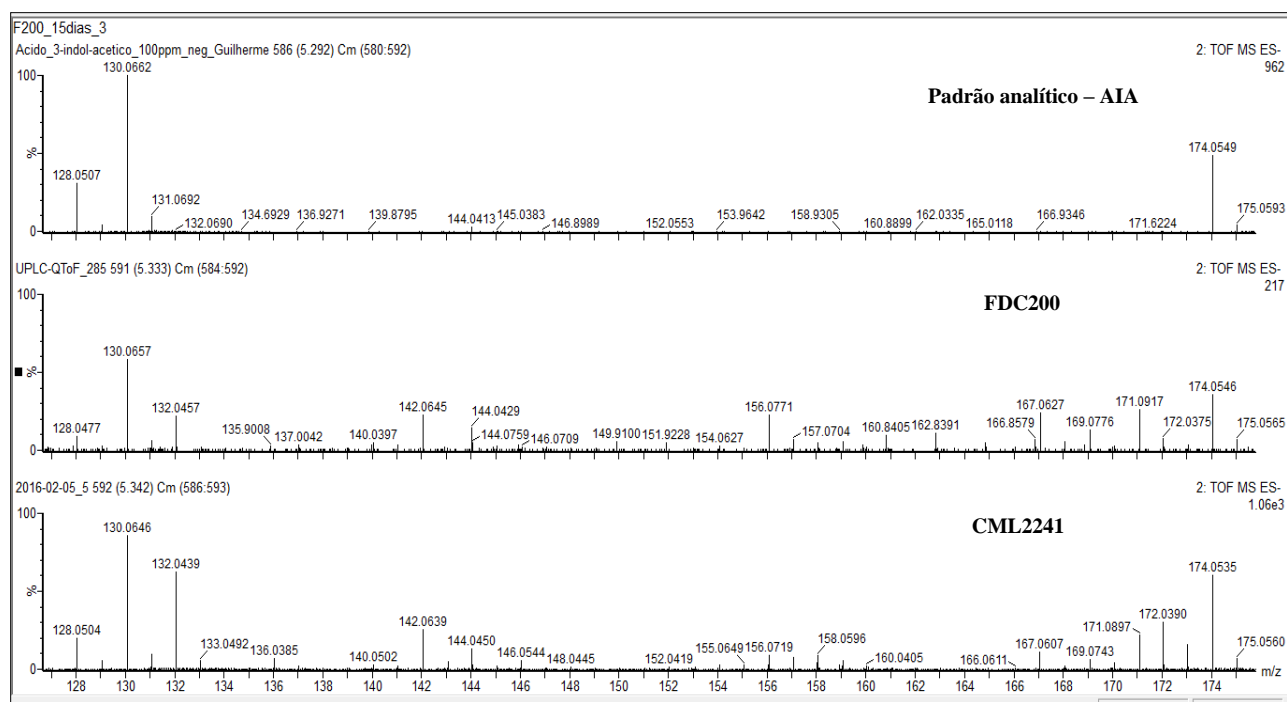


Figura 22. Íons fragmentos das amostras FDC200 e CML2241 em concordância com o mecanismo de fragmentação do padrão analítico: formação de um íon produto com m/z 130.06 a partir de um íon precursor de m/z 174.05.

6. DISCUSSÃO

Em seus ambientes naturais, as plantas precisam lidar com um vasto número de diferentes organismos, por muitos dos quais as mesmas são desafiadas. Destes encontros, os que ocorrem com micro-organismos, frequentemente, culminam em disputas travadas por crescimento e sobrevivência. Tendo em vista uma planta como principal fonte de energia para uma gama de micro-organismos, é admissível o fato de que plantas tenham desenvolvido opções de mecanismos de resistência, sejam eles constitutivamente ativos ou induzidos após o reconhecimento de algum agente externo em processo de invasão. Tais respostas de resistência são reguladas por fitormônios, que consistem em moléculas sintetizadas em baixas concentrações, atuando sinérgica e/ou antagonicamente em uma rede complexa de interação para reger aspectos da planta como crescimento, desenvolvimento, reprodução e respostas a estímulos do ambiente (Denancé *et al.*, 2013; Wani *et al.*, 2015).

Dentro deste contexto, a planta, geralmente, encontra-se no que pode ser cunhado como um dilema: é necessária a manutenção do equilíbrio entre desenvolver-se e defender-se. Alguns hormônios, principalmente aqueles que controlam respostas de crescimento da planta e exercem fundamental papel também na defesa da mesma, terminam figurando nos dois extremos deste equilíbrio (Ludwig-Müller, 2015). Paralelamente, estudos mostram concomitante desenvolvimento, por parte de patógenos, de sofisticados mecanismos moleculares para desregular a biossíntese de hormônios em plantas e/ou interferir em vias de sinalização dependentes de hormônios (Jones e Dangl, 2006; Tanaka *et al.*, 2011; González-Lamothe *et al.*, 2012; Denancé *et al.*, 2013). Em termos de interação planta-patógeno, a expressão ‘*arms race*’ (em português, corrida das armas), cunhada por Anderson *et al.* (2010), refere-se à coevolução de táticas de defesa e colonização, de plantas e micro-organismos, respectivamente. Se o equilíbrio hormonal pender para o lado da planta, então a planta ‘vence a corrida’. O oposto acontece se o patógeno for capaz de voltar o sistema hormonal para seu benefício. Então, o patógeno ‘vence a corrida’ (Ludwig-Müller, 2015).

O hormônio auxina é um destes hormônios envolvidos no desenvolvimento da planta, bem como em respostas de defesa, estando nos dois lados do equilíbrio mencionado. Até o momento, a auxina é mais estudada na sua forma AIA (ácido indol-acético), ao qual é atribuído funções como alongamento e divisão celular, respostas trópicas, desenvolvimento vascular, resposta a estímulos bióticos e abióticos e organização geral das raízes (Santner e Estelle, 2009; Kieffer *et al.*, 2010; González-Lamothe *et al.*, 2012). Entretanto, auxinas podem também impactar negativamente, interferindo em vias de sinalização de outros hormônios, como a citocinina, ou ainda no mecanismo PTI (*PAMP-triggered immunity*) de defesa da própria planta (Navarro *et al.*, 2006; Robert-Seilantantz, 2011; Naseem e Dandekar, 2012). Sendo assim, a supracitada coevolução de táticas de defesa da planta e colonização de micro-organismos, como fungos, confere a estes a capacidade de burlar o sistema de defesa da hospedeira, além de contribuir com o desequilíbrio hormonal, fazendo uso também da síntese do hormônio auxina.

A síntese de auxinas por fungos durante a invasão dos tecidos de planta é relatada em interações como a de *Moniliophthora perniciosa* – cacaueteiro (Kilaru *et al.*, 2007) *Magnaporthe oryzae* – arroz (Tanaka *et al.*, 2011) e *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* – trigo (Yin *et al.*, 2014). Em interações que desencadeiam sintomas semelhantes aos do superbrotamento em guaranazeiro, que partem do princípio de multiplicação exagerada de células, hipertrofia e hiperplasia celular,

registra-se um desequilíbrio na concentração do hormônio, o qual pode ser uma das causas destes sintomas (Lee *et al.*, 2009; Tooker e De Moraes, 2011; Yamagushi *et al.*, 2012; Bartlett e Connor, 2014; Teixeira *et al.*, 2014).

Assim, levando-se em conta estas características dos sintomas do superbrotamento em guaranazeiro e a etiologia da doença atribuída ao fungo *Fusarium decemcellulare* (Batista e Bolkan, 1982), o presente trabalho levantou a hipótese de que *F. decemcellulare* também é capaz de sintetizar auxina. O fungo, portanto, estaria se utilizando desta tática para burlar o sistema de defesa da planta, causando sintomas que seriam resultantes da perturbação hormonal durante a infecção. Deste modo, para testar a habilidade do fungo em produzir o hormônio auxina, indivíduos homotáticos e heterotáticos foram crescidos em dois meios de cultura diferentes: o meio BD, feito a partir de batata; e o meio MS, suplementado com o aminoácido triptofano, precursor da auxina. Tendo em vista os relatos da ocorrência de superbrotamento em outras culturas, como cacaueiro e mangueira (Reichle e Snyder, 1964; Guimarães 2013), que relacionam a doença apenas a indivíduos heterotáticos, esperava-se encontrar expressão de genes de vias de síntese de auxina somente em heterotáticos.

Após sequenciamento e montagem do genoma de *Fusarium decemcellulare*, foram feitas buscas de genes que codificassem enzimas envolvidas na síntese de auxina, conforme detalha o item 4.3.3., da seção Material e Métodos. Os primeiros indicativos da capacidade de síntese de auxina de *F. decemcellulare* surgiram após a identificação de genes componentes de vias de síntese do hormônio nesta etapa de busca no genoma, como mostram as Figuras 6-12, da seção 5.1. A localização dos genes pertencentes à via do indol-acetaldeído e seu desvio, reforçou ainda mais a hipótese, principalmente, porque dois dos genes envolvidos na via foram encontrados organizados em cluster (Figura 6), como ocorre por exemplo com os genes da via do indol-3-acetamida, em *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. fujikuroi* (Tsavkelova *et al.*, 2012). Além disso, a localização de genes pertencentes à via da triptamina consistiu em mais uma possibilidade para a síntese do hormônio. Desta forma, os primeiros indicativos de síntese de auxina por parte de *F. decemcellulare* foram localizados a nível genômico, sendo a próxima etapa de análises, portanto, saber se as duas vias estariam sendo expressas e por quais indivíduos: homotáticos e/ou heterotáticos.

Nas análises de expressão, foi observado que todos os genes das duas vias descobertas no genoma de *F. decemcellulare* foram expressos nos meios de cultura BD e MS, pelos dois tipos

sexuais – homotáticos e heterotáticos. A Tabela 5 detalha quais genes, de quais vias, foram expressos por quais indivíduos. Diferente do que era esperado, houve expressão de genes de vias de síntese também em indivíduos homotáticos, além da expressão em heterotáticos. A literatura conta com registros de fungos capazes de sintetizar o hormônio auxina, independentemente do tipo sexual, como ocorre com os homotáticos *Moniliophthora perniciosa* (Kilaru *et al.*, 2007; Kües e Navarro-González, 2010) e *Taphrina deformans* (Cissé *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2014) e com os heterotáticos *Magnaporthe oryzae* (Tanaka *et al.*, 2011; Saleh *et al.*, 2012) e *Fusarium proliferatum* (Waalwijk, *et al.*, 2004; Tsavkelova *et al.*, 2012). Um fato a ser investigado é o que foi observado quanto à expressão destes genes: os dois tipos sexuais, homotáticos e heterotáticos, não apresentam um padrão de expressão que os diferencie (Figura 17). Mesmo a nível de indivíduos, observou-se diferenças no que tange às vias de síntese de auxina expressas por cada isolado em cada meio de cultura avaliado (Tabela 6). Vale ressaltar que *Fusarium decemcellulare* trata-se de um complexo de espécies homotáticas e heterotáticas (Guimarães, 2013), ainda sem elucidações acerca deste grau de complexidade.

O conjunto de espécies do gênero *Taphrina*, composto por *T. wiesneri*, *T. deformans*, *T. flavorubra* e *T. populina*, que têm como hospedeiras plantas do gênero *Prunus* e *Populus*, provocam sintomas como vassoura-de-bruxa e uma espécie de tumefação nas folhas (Rodrigues e Fonseca, 2003; Tsai *et al.*, 2014). Tsai *et al.* (2014) levantam a hipótese de a causa destes sintomas tratar-se do desequilíbrio hormonal nos tecidos infectados da planta, ressaltando a relação da presença de genes de vias de síntese de AIA nos genomas das espécies de *Taphrina* com o desenvolvimento das doenças. Uma das vias de síntese do hormônio encontradas no conjunto de *Taphrina* spp. foi a via do indol-acetaldeído, que é a principal via de síntese do hormônio em *Ustilago maydis* (Reineke *et al.*, 2008). Assim como no conjunto de espécies do gênero *Taphrina* e em *U. maydis*, no presente trabalho foi detectada em *F. decemcellulare* a via do indol-acetaldeído, com duas putativas aminotransferases de aminoácidos aromáticos (passo 1 da via), uma putativa piruvato descarboxilase (passo 2 da via) e duas putativas indol-acetaldeído desidrogenases (passo 3 da via) (Tabela 5). A detecção destes genes foi realizada tanto a nível genômico (Figuras 6-9), quanto a nível transcriptômico, o que sugere que *F. decemcellulare* seja capaz de produzir auxina pela mesma via que *U. maydis* produz e que o conjunto *Taphrina* spp. pode ser capaz de produzir. Os resultados obtidos apontam ainda uma opção de desvio da via do indol-acetaldeído, através de uma putativa monooxigenase YUCCA, detectada a nível genômico

(Figura 10) e transcriptômico (Tabela 5). A síntese do hormônio através da proteína YUCCA consiste na principal forma de produção de AIA em *Arabidopsis* (Mashiguchi *et al.*, 2011), presente também de uma forma semelhante em *F. decemcellulare*, sugerindo mais um caminho ao produto final auxina no fungo.

Entre os genes diferencialmente expressos, destaca-se o ativador transcricional ARO 80, mais expresso no meio MS por indivíduos heterotáticos. Este ativador transcricional responde por ativar a expressão das enzimas ARO 9 e ARO 10 em *Saccharomyces cerevisiae* (Iraqi *et al.*, 1999; Lee e Hahn, 2013), em resposta a aminoácidos aromáticos. ARO 9 e ARO 10 são enzimas envolvidas nas conversões de triptofano em indol-piruvato e em indol-acetaldeído, respectivamente, que são os mesmos passos realizados pelas putativas enzimas da via do indol-acetaldeído, detectadas em *F. decemcellulare*.

Além da via do indol-acetaldeído e seu desvio pela proteína YUCCA, foi detectada em *F. decemcellulare* uma segunda via de síntese de AIA: a via da triptamina. A via da triptamina é conhecida como rota até a produção de AIA há algum tempo em bactérias como *Azospirillum brasilense* (Hartmann, *et al.*, 1983); em plantas, sendo melhor compreendida pelo trabalho de Zhao *et al.* (2001); e em fungos como *Fusarium delphinoides* (Kulkarni *et al.*, 2013). Em *F. decemcellulare* foram detectadas uma putativa descarboxilase de aminoácidos aromáticos (passo 1 da via) e uma putativa amina oxidase (passo 2 da via). Assim, *F. decemcellulare* possui mais uma provável via de síntese do hormônio auxina, com genes localizados a nível genômico (Figuras 11 e 12) e de expressão detectada nas condições testadas (Tabela 5).

Os resultados de expressão obtidos somam-se aos indicativos genômicos e sustentam a hipótese de síntese do hormônio auxina por parte de *F. decemcellulare*. Entretanto, não somente a nível genômico e transcriptômico, seria importante verificar a existência do produto destas possíveis vias de biossíntese no fungo. Com isso, a habilidade de síntese de AIA por parte de *F. decemcellulare* foi testada por meio do crescimento do fungo no meio de cultura MS, enriquecido com o precursor da auxina, o aminoácido triptofano. Após remoção dos micélios dos isolados FDC200 e CML2241, escolhidos para o teste, do meio de cultura, o líquido proveniente do crescimento de cada isolado foi então liofilizado para utilização em análises de cromatografia líquida de ultra performance acoplada a um sistema de espectrometria de massa. A molécula detectada no meio de cultura apresentou as mesmas características do padrão analítico de AIA usado na análise, sugerindo a capacidade de biossíntese de auxina por parte do fungo.

Como já discutido, o hormônio auxina é utilizado por plantas no seu desenvolvimento estrutural e orientação no ambiente e está envolvido na resposta de defesa a agentes invasores. Em doenças causadas por alguns patógenos, entretanto, o hormônio está fortemente relacionado ao desencadeamento da doença nas respectivas hospedeiras. Existem patógenos que se utilizam da própria maquinaria de síntese de auxina da planta para desencadear sintomas, que são os casos da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (Lee *et al.*, 2009) e de *Plasmodiophora brassicae* (Ludwig-Müller *et al.*, 2009; Jahn *et al.*, 2013). Em outros casos, eles “sequestram” a via de sinalização de auxina ou os conjugados AIA-aminoácido, gerados pela proteína GH3 da planta, como faz *Botrytis cinerea* em *Arabidopsis*, que sequestra o conjugado AIA-Asp para ativação de genes de patogenicidade. Outros patógenos, por conta própria, sintetizam o fitormônio auxina e essa habilidade é relacionada pelos estudos ao desenvolvimento de sintomas em suas hospedeiras, como são os casos já mencionados do conjunto de espécies do gênero *Taphrina* (Rodrigues e Fonseca, 2003; Tsai *et al.*, 2014), *Ustilago maydis* (Guevara-Lara, *et al.*, 2000; Reineke *et al.*, 2008) e *Moniliophthora perniciosa* (Kilaru *et al.*, 2007), por exemplo. Os dados aqui obtidos indicam que *F. decemcellulare* se utiliza de duas putativas vias de síntese do hormônio auxina. O fato de um patógeno também sintetizar auxina confere ao mesmo pelo menos duas vantagens: além do fitormônio impactar negativamente em outros hormônios (citocinina, por exemplo) e no mecanismo PTI de defesa da planta, como já discutido anteriormente, o AIA também é capaz de induzir a expressão de expansinas, responsáveis pelo afrouxamento da parede celular de células de plantas (Cosgrove *et al.*, 2002). Logo, a produção de auxina por parte de *F. decemcellulare* poderia sugerir também uma tática durante o processo de infecção do fungo, que interage com a parede celular para colonização do tecido, avançando pelos espaços extracelulares.

O acúmulo de auxina durante o processo de infecção relacionado ao afrouxamento da parede celular já foi proposto por Ding *et al.* (2008) e Fu *et al.* (2011), nos trabalhos acerca de interações com arroz de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* e *Magnaporthe grisea*, respectivamente. Isto, portanto, proporcionaria expansão celular e células com paredes menos rígidas, favorecendo melhor penetração de patógenos (Kazan e Manners, 2009; Ludwig-Müller, 2015).

Na literatura constam ainda registros do papel da parede celular no confinamento de doenças e, portanto, melhor resistência por parte da hospedeira. Este tipo de resposta de defesa está diretamente relacionado ao hormônio etileno, como sustentam os trabalhos de Brown (1978) e Lloyd *et al.* (2011). Brown (1978) observou que tangerinas tratadas com etileno se tornaram mais

resistentes à antracnose causada pelo patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, havendo um maior acúmulo de compostos fenólicos e lignina na parede celular. Por sua vez, Lloyd *et al.* (2011) constataram forte relação ao hormônio etileno do reforço de hidroxicinamatos e monolignóis na parede celular, o que confere maior resistência de *Arabidopsis* a *Botrytis cinerea*. O hormônio etileno tem suma importância em situações de estresse abiótico, mas também em casos de interações planta-patógeno. A produção do fitormônio por parte da planta pode ser induzida pela invasão do patógeno e suas toxinas, tendo o hormônio a capacidade de ativar processos de defesa da planta, como a produção de fitoalexinas, fenilpropanóides e alterações na parede celular, como mencionado (Bell, 1981; Bleecker e Kende, 2000; Díaz *et al.*, 2002).

Curiosamente, o fungo *F. decemcellulare* possui a nível genômico (Figura A1 - Anexos) e transcriptômico uma putativa aminociclopropano (ACC) deaminase, que tem como função clivar o precursor do etileno, ACC, resultando em amônia e α -cetobutirato (Honma e Shimomura, 1978; Nascimento *et al.*, 2014). A Tabela 7 reúne quais isolados expressam a enzima e em quais meios de cultura:

Tabela 7. Aminociclopropano deaminase expressa por *Fusarium decemcellulare*.

ENZIMA	LOCO	ISOLADO	
1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase	Chr 5: 3802092-3802968	<input checked="" type="checkbox"/> FDC200	<input checked="" type="checkbox"/> CML0038
		<input checked="" type="checkbox"/> FDC272	<input checked="" type="checkbox"/> CML0800
		<input checked="" type="checkbox"/> FDC307	<input type="checkbox"/> CML2241

Chr: cromossomo.

☒ Expresso em meio BD e em meio MS.

☒ Expresso somente em meio BD.

☒ Expresso somente em meio MS.

É possível observar que, com relação a esta enzima, também não existe qualquer padrão que diferencie homotáticos de heterotáticos. Com exceção do isolado CML2241, todos os outros isolados sintetizam ACC deaminase, em BD e/ou MS. Novamente foi verificado que não existe também um padrão em termos de meio de cultura e que se observam diferenças já no nível de indivíduos. No entanto, seja em BD ou MS, 5 dos 6 isolados aqui avaliados expressam a enzima ACC deaminase. A expressão desta enzima soma-se à habilidade de sintetizar auxina para formar um provável conjunto de atributos que conferem a *F. decemcellulare* posição oposta à das plantas na disputa entre forças de colonização e defesa, respectivamente. Ter a capacidade de degradar o

precursor do etileno pode significar mais uma forma de interferir nas concentrações de fitormônios no local da infecção e, com isso, desregular todo um sistema dependente destes hormônios para defesa da planta e contenção do avanço do patógeno.

Os dados até o presente momento obtidos permitem lançar luz sobre pelo menos dois prováveis componentes do possível vasto conjunto de estratégias de *F. decemcellulare* para colonização: a capacidade de síntese de auxina e de bloqueio da produção de etileno da planta. A possível capacidade de sintetizar auxina significa uma opção de atenuar o sistema de imunidade inata da planta, interferindo nos mecanismos de defesa PTI e ETI (*effector-triggered immunity*), sendo este segundo ativado quando o patógeno secreta fatores de virulência (efetores) que reprimem o mecanismo PTI (Boller e He, 2009; Xin e He, 2013; Naseem *et al.*, 2015). Além disso, conjugados do hormônio auxina, como o conjugado AIA-Asp, gerado pela proteína GH3, podem contribuir com a regulação de genes de virulência do patógeno, como ocorre com *Botrytis cinerea* e *Pseudomonas syringae*, em *Arabidopsis* (González-Lamothé *et al.*, 2012). A auxina sintetizada pelo patógeno pode auxiliar ainda durante a penetração do mesmo no tecido da hospedeira, uma vez que induz a expressão de expansinas, que afrouxam a parede celular das células da planta (Cosgrove *et al.*, 2002). A provável capacidade de *F. decemcellulare* de bloquear a síntese de etileno por parte da planta contribui com mais uma opção de driblar o sistema de defesa e contenção da planta, uma vez que o etileno está envolvido na produção de fitoalexinas e fenilpropanoides e também nas alterações na parede celular, com o reforço por meio de hidroxycinamatos e monolignóis (Brown, 1978; Bell, 1981; Bleecker e Kende, 2000; Díaz *et al.*, 2002; Lloyd *et al.*, 2011).

Os resultados por este trabalho obtidos, portanto, sustentam a hipótese do seguinte cenário: levando-se em conta o momento em que o guaranazeiro está sendo colonizado por *F. decemcellulare*, a concentração natural de auxinas em dado tecido da planta iria se somar à dose exógena do hormônio proveniente do fungo. Supõe-se, então, que a situação atual, agora de consequente desequilíbrio hormonal, estimularia a planta a controlar o quadro. O mecanismo de homeostase de auxina, baseado nas proteínas GH3 (seção Revisão Bibliográfica), conjuga a molécula de AIA com aminoácidos, açúcares e peptídeos em ligações reversíveis e irreversíveis. Assim, uma parcela do hormônio, portanto, passaria a não estar mais disponível, uma vez que conjugados como AIA-Glu e AIA-Asp configuram indisponibilidade das moléculas de AIA ligadas irreversivelmente a estes aminoácidos (primeiro fator redutivo do teor de auxina) (Woodward e

Bartel, 2005; Ludwig-Müller, 2011). Encontrando-se em situação de invasão de um agente externo, a planta então precisaria ativar seu sistema de imunidade inata, valendo ressaltar que em detrimento da síntese de auxina (segundo fator redutivo do teor de auxina). A condição de invasão de um agente externo ativaria também vias de síntese, sinalização e transporte do hormônio etileno, após reconhecimento do agente invasor no ato da penetração. A concentração deste hormônio, então, se elevaria, enquanto que *F. decemcellulare* expressaria a enzima ACC deaminase (degrada o precursor do etileno), na tentativa de conter o sistema de defesa da planta dependente de etileno.

Sendo assim, portanto, os sintomas característicos do superbrotamento causado por *Fusarium decemcellulare* em guaranazeiro seriam o reflexo da disputa de táticas de colonização e defesa entre o fungo e a planta, respectivamente. O superbrotamento de gemas, galhas e a hiperplasia floral, que partem do princípio de multiplicação exagerada de células e estruturas, podem ser reflexo do desequilíbrio de auxina causado pela dose a mais introduzida por *F. decemcellulare* durante a infecção, dadas as funções já discutidas deste hormônio. O encurtamento observado nos ramos do sintoma superbrotamento de gemas pode ser reflexo da tentativa de equilibrar o teor de auxina, por parte da planta, reduzindo a concentração via proteínas GH3. Desta forma, os dados aqui obtidos sugerem que *F. decemcellulare*, nas suas formas heterotáticas e homotáticas, seria capaz de avançar o processo de infecção e desencadear os sintomas do superbrotamento em guaranazeiro utilizando-se da possível capacidade de síntese de auxina e bloqueio de etileno, sendo os sintomas da doença uma consequência do desequilíbrio hormonal causado pelo fungo.

7. CONCLUSÕES

Fusarium decemcellulare está relacionado com o desenvolvimento de sintomas como superbrotamento de gemas vegetativas e florais e galhas em uma gama de hospedeiros, dentre eles, o guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). Os sintomas partem basicamente do princípio de multiplicação exagerada de células e estruturas, havendo na literatura indícios que suportam o desequilíbrio de auxina causado pelo patógeno como possível causa deste tipo de doença em outros hospedeiros. O presente trabalho levantou a hipótese de que isolados heterotáticos de *F. decemcellulare* sejam capazes de sintetizar auxina, uma vez que isolados homotáticos são reportados na literatura como sendo não-patogênicos. Com base nos resultados aqui obtidos, sugere-se, pelo menos, duas vias de síntese do hormônio, tanto em indivíduos heterotáticos, quanto em indivíduos homotáticos: a via do indol-acetaldeído, o desvio desta via e a via da triptamina. Não somente a níveis genômico e transcriptômico, obteve-se como resultado também a detecção de moléculas de AIA (ácido indol-3-acético) no meio de cultura MS, tanto no crescimento do isolado heterotático (FDC200), quanto no crescimento do isolado homotático (CML2241). A detecção do hormônio em meio de cultura, juntamente com os indicativos genômicos e transcriptômicos, sugerem a habilidade de biossíntese do hormônio auxina por parte dos dois tipos sexuais de *F. decemcellulare* – heterotáticos e homotáticos.

A possível capacidade de degradação do precursor do etileno, através da putativa ACC deaminase, figura ainda como mais uma opção de tática de colonização de *F. decemcellulare* com fins de driblar o sistema de defesa e contenção da planta. Sendo assim, o presente trabalho lança luz sobre duas das possíveis estratégias de colonização de *F. decemcellulare*, com consequente desencadeamento do superbrotamento em guaranazeiro: a capacidade de síntese de auxina e de bloqueio da síntese de etileno na planta. Estas possíveis causas da doença aqui apontadas, portanto, compõem um conjunto de informações de suma importância para guiar futuros experimentos, na tentativa de se obter formas eficientes de controle do superbrotamento na cultura do guaranazeiro.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi realizado pelo mestrando Igor Kelvyn Cavalcante Lobo, do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFAM. O propósito do trabalho foi gerar conhecimentos acerca dos possíveis mecanismos dos quais se utiliza o fungo *Fusarium decemcellulare* para desencadeamento do superbrotamento em guaranazeiro. Aqui iniciou-se a busca por genes de vias de síntese de auxina, bem como suas expressões.

A partir dos resultados obtidos, sabe-se, então, do potencial que tem *F. decemcellulare* para a síntese do hormônio auxina, além de prováveis outras táticas, como a degradação do precursor do etileno através da enzima ACC deaminase. Estes resultados contribuem para elencar informações necessárias ao entendimento do desencadeamento da doença e, com isso, favorecer o desenvolvimento de táticas eficientes de controle. Além disso, o trabalho pode fundamentar novos experimentos daqui em diante, uma vez que é necessário reforçar os achados do estudo a fim de confirmar a hipótese levantada inicialmente, bem como as outras hipóteses que surgiram, consequentemente. Dentro deste contexto, pretende-se avaliar a patogenicidade de ambos os tipos sexuais do fungo, homotático e heterotático, a partir de testes de inoculação. Vale ressaltar que a capacidade de síntese de auxina foi observada também em indivíduos homotáticos, diferente da expectativa da hipótese inicial. Sendo assim, testes de patogenicidade preencheriam lacunas resultantes dos dados aqui obtidos. É importante frisar também que novos experimentos de detecção de AIA em meio de cultura, desta vez de caráter quantitativo, fazem-se necessários. Assim, seria possível investigar se existe alguma diferença na quantidade de auxina secretada pelos dois tipos sexuais e que pode estar relacionada com o fato de indivíduos homotáticos não serem patogênicos em outras culturas. Há, ainda, a necessidade de avaliar se existem outras prováveis vias de síntese de outros fitormônios, como giberelina e citocinina, e se estas vias estão presentes também nos dois tipos sexuais.

O presente trabalho, portanto, fornece importantes informações a respeito do desenvolvimento do superbrotamento em guaranazeiro, pode fundamentar novos experimentos e contribui como base para elaboração de táticas eficientes de manejo e controle da doença.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alkan, N.; Friedlander, G.; Ment, D.; Prusky, D.; Fluhr, R. 2015. Simultaneous transcriptome analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* and tomato fruit pathosystem reveals novel fungal pathogenicity and fruit defense strategies. *New Phytologist*, 205(2): 801-815.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25 (17): 3389-3402.
- Anderson, J. P.; Gleason, C. A.; Foley, R. C.; Thrall, P. H.; Burdon, J. B.; Singh, K. B. 2010. Plants versus pathogens: an evolutionary arms race. *Functional plant biology*, 37: 499-512.
- Andrews, S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Disponível em: <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>. Acesso em: 08/08/2016.
- Araújo, J. C. A.; Pereira, J. C. R.; Gasparotto, L.; Arruda, M. R. 2006. O complexo superbrotamento do guaranazeiro e seu controle. Disponível em: <http://servicos.cpaa.embrapa.br/livraria/arquivos_gratis/ComTec_45_2006.pdf>. Acesso em: 16/01/2015.
- Barash, I.; Manulis-Sasson, S. 2009. Recent Evolution of Bacterial Pathogens: The Gall-Forming *Pantoea agglomerans* Case. *Annual Reviews Phytopathology*, 47: 133-152.
- Basile, A.; Ferrara, L.; Dez Pezzo, M.; Mele, G.; Sorbo, S.; Bassi, P.; Montesano, D. 2005. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart.. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(1): 32-36.
- Bartlett, L.; Connor, E. F. 2014. Exogenous phytohormones and the induction of plant galls by insects. *Arthropod-Plant Interactions*, 8: 339-348.

- Bastos, C. N.; Santos, A. O. 2001. Superbrotamento de inflorescências do Limão-de-Caiena causado por *Fusarium decemcellulare*. *Fitopatologia Brasileira*, 26(2): 222.
- Batista, M. F. 1983. Doenças do Guaranazeiro. Disponível em:< <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/665065>>. Acesso em: 16/01/2015.
- Batista, M. F.; Bolkan, H. A. 1982. O superbrotamento do guaranazeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 7: 315-317.
- Bell, A. A. 1981. Biochemical Mechanisms of Disease Resistance. *Annu. Rev. Plant Physio.*, 32: 21-81.
- Blakeslee, A. F. 1904. Sexual reproduction in the Mucorineae. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences*, 40(4): 205-319.
- Bleecker, A. B.; Kende, H. 2000. Ethylene: A Gaseous Signal Molecule in Plants. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 16: 1-18.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, btu170.
- Boller, T.; He, S. Y. 2009. Innate immunity in plants: An arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*, 324(5928): 742-744.
- Boozer, C. N.; Nasser, J. A.; Heymsfield, S. B.; Wang, V.; Chen, G.; Solomon, J. L. 2001. An herbal supplement containing Ma Huang-Guarana for weight loss: a randomized, double-blind trial. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 25(3): 316-324.
- Brioso, P. S. T. 2012. Cancro em *Calycophyllum spruceanum* no Estado do Rio de Janeiro. *Summa Phytopathology*, 38(1): 97.

- Brown, G. E. 1978. Hypersensitive response of Orange-colored Robinson tangerines to *Colletotrichum gloeosporioides* after ethylene treatment. *Citology and Histology*, 700-706.
- Caniceiro, B. D. 2012. *Efeitos da Paullinia cupana e de seus principais compostos ativos na modulação da resposta imune*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, São Paulo. 120p.
- Castro, N. H. C. 1992. Cultura do Guaranazeiro. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/387092>>. Acesso em: 16/01/2015.
- Chalupowicz, L.; Barash, I.; Schwartz, M.; Aloni, R.; Manulis, S. 2006. Comparative anatomy of gall development on *Gypsophila paniculata* induced by bacteria with different mechanisms of pathogenicity. *Planta*, 224: 429-437.
- Chiwocha, S.D.S.; Abrams, S.R.; Ambrose, S.J.; Cutler, A.J.; Loewen, M.; Ross, A.R.S.; Kermode, A.R. 2003. A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: An analysis of hormone regulation of thermodormancy of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds. *Plant J.*, 35: 405–417.
- Chung, K. –R.; Shilts, T.; Ertürk, U.; Timmer, L. W.; Ueng, P. P. 2003. Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. *FEMS Microbiology Letters*, 226: 23-30.
- Cissé, O. H.; Almeida, J. M. G. C. F.; Fonseca, A.; Kumar, A. A.; Salojarvi, J.; Overmyer, K.; Hauser, P. M.; Pagni, M. 2013. Genome Sequencing of the Plant Pathogen *Taphrina deformans*, the Causal Agent of Peach Leaf Curl. *mBio*, 4(3).
- CONAB. 2012. Guaraná – Período: 08/2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_09_12_08_38_56_guaranaagosto2012.pdf>. Acesso em: 15/01/2015.

- CONAB. 2013. Guaraná – Período: 01 – 31/09/2013. Disponível em: <
[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_10_18_15_45_38_guaranasetem
 bro2013.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_10_18_15_45_38_guaranasetembro2013.pdf)>. Acesso em: 15/01/2015.
- CONAB. 2014. Guaraná – Período: 01 a 31/08/2014. Disponível em: <
[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_09_09_17_32_05_guarana_agost
 o_2014.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_09_09_17_32_05_guarana_agosto_2014.pdf)>. Acesso em: 15/01/2015.
- CONAB. 2015. Guaraná – Período: 01 a 31/12/2015. Disponível em: <
[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_01_29_08_49_06_guarana_-
 _dez_2015.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_01_29_08_49_06_guarana_-_dez_2015.pdf)>. Acesso em: 10/05/2015..
- CONAB. 2016. Guaraná – Período: 01 a 31/05/2016. Disponível em
 <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_06_17_10_04_59_guarana_-
 _maio_2016.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_06_17_10_04_59_guarana_-_maio_2016.pdf)>
- Cosgrove, D. J.; Li, L. C.; Cho, H-T.; Hoffman-Benning, S.; Moore, R. C.; Blecker, D. 2002. The Growing World of Expansins. *Plant Cell Physiology*, 43(12): 1436-1444.
- Denancé, N.; Sánchez-Vallet, A.; Goffner, D.; Molina, A. 2013. Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Frontiers in Plant Science*, 4.
- Díaz, J.; Have, A.; van Kan, A. L. 2002. The Role of Ethylene and Wound Signaling in Resistance of Tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, 129: 1341-1351.
- Ding, X.; Cao, Y.; Huang, L.; Zhao, J.; Xu, C.; Li, X.; Wang, S. 2008. Activation of the Indole-3-Acetic Acid–Amido Synthetase GH3-8 Suppresses Expansin Expression and Promotes Salicylate- and Jasmonate-Independent Basal Immunity in Rice. *The Plant Cell*, 20: 228-240,

- Dorchin, N.; Hoffmann, J. H.; Stirk, W. A.; Novák, O.; Strnad, M.; Staden, J. V. 2009. Sexually dimorphic gall structures correspond to differential phytohormone contents in male and female wasp larvae. *Physiological Entomology*, 34: 359-369.
- Duarte, M. L. R.; Albuquerque, F. C.; Corrêa, M. P. F.; Batista, M. F. 1983. Doenças da cultura do guaraná no trópico úmido. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/383040>>. Acesso em: 16/01/2015.
- Duke, J. A.; Bogenschutz-Godwin, M. J.; duCellier, J.; Duke, P.-A. K. 2002. *Handbook of Medicinal Herbs*, 2^a ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Fu, J.; Liu, H.; Li, Y.; Yu, H.; Li, X.; Xiao, J.; Wang, S. 2011. Manipulating Broad-Spectrum Disease Resistance by Suppressing Pathogen-Induced Auxin Accumulation in Rice. *Plant Physiology*, 155: 589-602.
- Gerlach, W.; Nirenberg, H. 1982. *The Genus Fusarium – A Pictorial Atlas*. Disponível em: <<http://www.bba.de/veroeff/mitt/pdfs/mitt209.pdf>>. Acesso em: 17/01/2015.
- Gisbert, C.; Trujillo-Moya, C.; Sánchez-Torres, P.; Sifres, A.; Sánchez-Castro, E.; Nuez, F. 2013. Resistance of pepper germplasm to *Meloidogyne incognita*. *Annals of Applied Biology*, 162: 110-118.
- González-Lamothe, R.; Oirdi, M. E.; Brisson, N.; Bouarab, K. 2012. The Conjugated Auxin Indole-3-Acetic Acid–Aspartic Acid Promotes Plant Disease Development. *The Plant Cell*, 24: 762-777.
- Götz, S.; García-Gómez, J. M.; Terol, J.; Williams, T. D.; Nagaraj, S. H.; Nueda, M. J.; Robles, M.; Talón, M.; Dopazo, J.; Conesa, A. 2008. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research*, 36(10): 3420-3435.

- Guevara-Lara, F.; Valverde, M. E.; Paredes-López, O. 2000. Is pathogenicity of *Ustilago maydis* (huitlacoche) strains on maize related to in vitro production of indole-3-acetic acid? *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 16: 481-490.
- Guimarães, E. A. 2013. *Biologia reprodutiva, filogenia e patogenicidade de Fusarium decemcellulare*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras. Lavras, Minas Gerais. 68p.
- Hamerski, L.; Somner, G. V.; Tamaio, N. 2013. *Paullinia cupana* Kunth (Sapindaceae): A review of its ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(30): 2221-2229.
- Hartmann, A.; Singh, M.; Klingmüller, W. 1983. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. *Can. J. Microbiol.*, 916-923.
- Henman, A. R. 1982. Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the Central Amazon Basin. *Journal of Ethnopharmacology*, 6:311-338.
- Honma, M.; Shimomura, T. 1978. Metabolism of l-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid. *Agri. Biol. Chem.*, 42(10): 1825-1831.
- Iraqi, I.; Vissers, S.; André, B.; Urrestarazu, A. 1999. Transcriptional Induction by Aromatic Amino Acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 19(5): 3360-3371.
- Jahn, L.; Mucha, S.; Bergman, S.; Horn, C.; Staswick, P.; Steffens, B.; Siemens, J.; Ludwig-Müller, J. 2013. The Clubroot Pathogen (*Plasmodiophora brassicae*) Influences Auxin Signaling to Regulate Auxin Homeostasis in *Arabidopsis*. *Plants*, 2: 726-749.

- Jones, J. D. G.; Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444.
- Junqueira, N. T. V.; Santiago, D. V. R.; Pinto, A. C. Q.; Chaves, R. C. 2001. Principais doenças da fruteira-do-conde no cerrado. Disponível em:< www.cpac.embrapa.br/download/4/t>. Acesso em: 21/01/2015.
- Kazan, K.; Manners, J. M. 2009. Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, 14(7): 373-382.
- Ke, X.; Yin, Z.; Song, N.; Dai, Q.; Voegelé, R. T.; Liu, Y.; Wang, H.; Gao, X.; Kang, Z.; Huang, L. 2014. Transcriptome profiling to identify genes involved in pathogenicity of *Valsa mali* on apple tree. *Fungal Genetics and Biology*, 68: 31-38.
- Kennedy, D. O.; Haskell, C. F.; Robertson, B.; Reay, J.; Brewster-Maund, C.; Luedemann, J.; Maggini, S.; Ruf, M.; Zangara, A.; Scholey, A. B. 2008. Improved cognitive performance and mental fatigue following a multi-vitamin and mineral supplement with added guaraná (*Paullinia cupana*). *Appetite*, 50(2-3): 506-513.
- Kieffer, M.; Neve, J.; Kepinski, S. 2010. Defining auxin response contexts in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol*, 13: 12–20.
- Kilaru, A.; Bailey, B. A.; Hasenstein, K. H. 2007. *Moniliophthora perniciosa* produces hormones and alters endogenous auxin and salicylic acid in infected cocoa leaves. *FEMS Microbiology Lett.*, 274: 238-244.
- Kim, D.; Pertea, G.; Trapnell, C.; Pimentel, H.; Kelley, R.; Salzberg, S.L. 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology*, 14:R36.
- Kopylova E.; Noé L.; Touzet, H. 2012. SortMeRNA: Fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*, doi: 10.1093/bioinformatics/bts611.

- Kües, U.; Navarro-Gonzalez, M. 2010. Mating-type orthologous genes in the primarily homothallic *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of Witches' Broom Disease in cacao. *Journal of Basic Microbiology*, 50: 442-451.
- Kulkarni, G. B.; Sanjeevkumar, S.; Kirankumar, B.; Santoshkumar, M.; Karegoudar, T. B. 2013. Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis in *Fusarium delphinoides* Strain GPK, a Causal Agent of Wilt in Chickpea. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 169: 1292-1305.
- Langmead B.; Salzberg S. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9:357-359.
- Lee, C.-W.; Efetova, M.; Engelman, J. C.; Kramell, R.; Wasternack, C.; Ludwig-Müller, J.; Hedrich, R.; Deeken, R. 2009. *Agrobacterium tumefaciens* Promotes Tumor Induction by Modulating Pathogen Defense in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 21: 2948-2962.
- Lee, K.; Hahn, J-S. 2013. Interplay of Aro80 and GATA activators in regulation of genes for catabolism of aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 88(6): 1120-1134.
- Le Floch, G.; Rey, P.; Benizri, E.; Benhamou, N.; Tirilly, Y. 2003. Impact of auxin-compounds produced by the antagonistic fungus *Pythium oligandrum* or the minor pathogen *Pythium* group F on plant growth. *Plant and Soil*, 257: 459-470.
- Leslie, J. F.; Summerell, B. A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*, 1^a Ed., Blackwell Publishing.
- Liu, J-J.; Chan, D.; Xiang, Y.; Williams, H.; Li, X-R.; Snieszko, R. A.; Sturrock, R. N. 2016. Characterization of Five Novel Mitoviruses in the White Pine Blister Rust Fungus *Cronartium ribicola*. *Plos One*, 11(5).

- Liu, C.; Liu, T.; Yuan, F.; Gu, Y. 2010. Isolating endophytic fungi from evergreen plants and determining their antifungal activities. *African Journal of Microbiology Research*, 4(21): 2243-2248.
- Lloyd, A. J.; Allwood, J. W.; Winder, C. L.; Dunn, W. B.; Heald, J. K.; Cristescu, S. M.; Sivakumaran, A.; Harren, F. J. M.; Mulema, J.; Denby, K.; Goodacre, R.; Smith, A. R.; Mur, L. A. J. 2011. Metabolomic approaches reveal that cell wall modifications play a major role in ethylene-mediated resistance against *Botrytis cinerea*. *The Plant Journal*, 67: 852-868.
- Lobo, I. K. C.; Silva, A. F.; Souza, A.; Silva, J. A.; Souza, N. R.; Filho, F. J. N.; Silva, G. F.; Hanada, R. 2013. Using BOX and ERIC-PCR to differentiate *Fusarium decemcellulare* isolated from guarana plant. *Anais do 46º Congresso Brasileiro de Fitopatologia*, Resumo: 649-2.
- Lombard, L.; Bogale, M.; Montenegro, F.; Wingfield, B. D.; Wingfield, M. J. 2008. A new bark canker disease of the tropical hardwood tree *Cedrelinga cateniformis* in Ecuador. *Fungal Diversity*.
- Ludwig-Müller, J. 2011. Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(6): 1757-1773.
- Ludwig-Müller, J. 2015. Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: Balance between development and defense. *Journal of Plant Physiology*, 172: 4-12.
- Majhenic, L.; Skerget, M.; Knez, Z. 2007. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104(3): 1258-1268.
- Maor, R.; Haskin, S.; Levi-Kedmi, H.; Sharon, A. 2004. In Planta Production of Indole-3-Acetic Acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3): 1852-1854.

- Mashiguchi, K.; Tanaka, K.; Sakai, T.; Sugawara, S.; Kawaide, H.; Natsume, M.; Hanada, A.; Yaeno, T.; Shirasu, K.; Yao, H.; McSteen, P.; Zhao, Y.; Hayashi, K-I.; Kamiya, Y.; Kasahara, H. 2011. The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. *PNAS*, 108(45): 18512-18517.
- Matos, K. S.; de Almeida, L. B.; Nascimento, A. R.; Hanada, R. E.; da Silva, G. F. 2016. Inflorescence Oversprouting and Vascular and Rachis Necrosis Caused by *Fusarium decemcellulare* in *Anacardium occidentale* in Brazil. *Plant disease*. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-01-16-0015-PDN>>. Acesso em: 24/06/2016.
- Matsuda, F.; Miyazawa, H.; Wakasa, K.; Miyagawa, H. 2005. Quantification of indole-3- acetic acid and amino acid conjugates in rice by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 69: 778–783.
- Medentsev, A. G.; Akimenko, V. K. 1992. Mechanism of phytotoxic action of naphthoquinone pigments of the fungus *Fusarium decemcellulare*. *Phytochemistry*, 31(1): 77-79.
- Medentsev, A. G.; Arinbarasova, A.; Aimenko, V. K. 2001. Adaptation of the phytopathogenic fungus *Fusarium decemcellulare* to oxidative stress. *Mikrobiologiia*, 70(1): 34-38.
- Medentsev, A. G.; Arinbarasova, A.; Akimenko, V. K. 2002. Respiratory activity and naphthoquinone synthesis in the fungus *Fusarium decemcellulare* exposed to oxidative stress. *Mikrobiologiia*, 71(2): 176-182.
- Morante-Carriel, J.; Sellés-Marchart, S.; Martínez-Márquez, A.; Martínez-Esteso, M. J.; Luque, I.; Bru-Martínez, R. 2014. RNA isolation from loquat and other recalcitrant woody plants with high quality and yield. *Analytical Biochemistry*, 452: 46-53.

- Nascimento, F. X.; Rossi, M. J.; Soares, C. R. F. S.; McConkey, B. J.; Glick, B. R. 2014. New Insights into 1- Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Deaminase Phylogeny, Evolution and Ecological Significance. *Plos One*, 9(6).
- Nascimento Filho, F. J.; Ando, A.; Cruz, C. D.; Garcia, T. B. 1993. Análise de caminhamento em mudas de Guaraná. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 28 (4): 447-452.
- Naseem, M.; Dandekar, T. 2012. The Role of Auxin-Cytokinin Antagonism in PlantPathogen Interactions. *Plos Pathogens*, 8(11).
- Naseem, M.; Kaltdorf, M.; Dandekar, T. 2015. The nexus between growth and defence signalling: auxin and cytokinin modulate plant immune response pathways. *Journal of Experimental Botany*.
- Navarro, L.; Dunoyer, P.; Jay, F.; Arnold, B.; Dharmasiri, N.; Estelle, M.; Voinnet, O.; Jones, J. D. G. 2006. *Science*, 312: 436-439.
- O'Connell, R. J.; Thon, M. R.; Hacquard, S.; Amyotte, S. G.; Kleemann, J.; Torres, M. F.; Damm, U.; Buiate, E. A.; Epstein, L.; Alkan, N.; Altmüller, J.; Alvarado-Balderrama, L.; Bauser, C. A.; Becker, C.; Birren, B. W.; Chen, Z.; Choi, J.; Crouch, J. A.; Duvick, J. P.; Farman, M. A.; Gan, P.; Heiman, D.; Henrissat, B.; Howard, R. J.; Kabbage, M.; Koch, C.; Kracher, B.; Kubo, Y.; Law, A. D.; Lebrun, M.-H.; Lee, Y.-H.; Miyara, I.; Moore, N.; Neumann, U.; Nordstrom, K.; Panaccione, D. G.; Panstruga, R.; Place, M.; Proctor, R. H.; Prusky, D.; Rech, G.; Reinhardt, R.; Rollins, J. A.; Rounsley, S.; Schardl, C. L.; Schwartz, D. C.; Shenoy, N.; Shirasu, K.; Sikhakolli, U. R.; Stuber, K.; Sukno, S. A.; Sweigard, J. A.; Takano, Y.; Takahara, H.; Trail, F.; van der Does, H. C.; Voll, L. M.; Will, I.; Young, S.; Zeng, Q.; Zhang, J.; Zhou, S.; Dickman, M. B.; Schulze-Lefert, P.; van Themaat, E. V. L.; Ma, L.-J.; Vaillancourt, L. J. 2012. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics*, 44(9): 1060-1067.

- Patten, C. L.; Glick, B. R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applies and Environmental Microbiology*, 68(8): 3795-3801.
- Poletto, I.; Muniz, M. F. B.; Ceconi, D. E.; Santin, D.; Weber, M. N. D.; Blume, E. 2006. Zoneamento e Identificação de *Fusarium* spp. causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguari*). *Ciência Florestal*, 16(1): 1-10.
- Qi, Y.-X.; Pu, J.-J.; Zhang, X.; Zhang, H.; Lu, Y.; Yu, Q.-F.; Zhang, H.-Q.; Xie, Y.-X. 2013. First Report of Dieback of Mango Caused by *Fusarium decemcellulare* in China. *Journal of Phytopathology*, 161(10): 735-738.
- Rahmatallah, Y.; Emmert-Streib, F.; Glazko, G. 2014. Comparative evaluation of gene set analysis approaches for RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics*.
- Reichle, R. E.; Snyder, W. C. 1964. Heterothallism and ascospore number in *Calonectria rigidiuscula*. *Phytopathology*, 54(10): 1297-1299.
- Reineke, G.; Heinze, B.; Schirawski, J.; Buettner, H.; Kahmann, R.; Basse, C. W. 2008. Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation.
- Robert-Seilaniantz, Grant, M.; Jones, J. D. G. 2011. Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just Jasmonate-Salicylate Antagonism. *The Annual Review of Phytopathology*, 49: 317-343.
- Robinson, M.; Riov, J.; Sharon, A. 1998. Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis in *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12): 5030-5032.

- Rodrigues, M. G.; Fonseca, A. 2003. Molecular systematics of the dimorphic ascomycete genus *Taphrina*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 607-616.
- Rondón, A.; Solórzano, R.; Materán, M. 1983. Agallas o escobas de brujas Del mango (*Mangifera indica* L.) em Venezuela. *Agronomía Tropical*, 33(1-6): 163-176.
- Saleh, D.; Xu, P.; Shen, Y.; Li, C.; Adreit, H.; Milazzo, J.; Ravigné, V.; Bazin, E.; Nottéghem, J-L.; Fournier, E.; Tharreau, D. 2012. Sex at the origin: an Asian population of the rice last fungus *Magnaporthe oryzae* reproduces sexually. *Molecular Ecology*, 21: 1330-1344.
- Santner, A.; Estelle, M. 2009. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature*, 459: 1071–1078.
- Serrato-Diaz, L. M.; Perez-Cuevas, M.; Rivera-Vargas, L. I.; Goenaga, R.; French-Monar, R. D. 2015. First Report of *Fusarium decemcellulare* Causing Inflorescence Wilt and Vascular and Flower Necrosis of Rambutan (*Nephelium lappaceum*), Longan (*Dimocarpus longan*), and Mango (*Mangifera indica*). *Plant disease*, 99(8): 1187.
- Sfalsin, E. 2012. *Caracterização morfológica e molecular de Fusarium decemcellulare, agente etiológico da galha-floral em cacaueiro*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras. Lavras, Minas Gerais. 37p.
- Schliebner, I.; Becher, R.; Hempel, M.; Deising, H. B.; Horbach, R. 2014. New gene models and alternative splicing in the maize pathogen *Colletotrichum graminicola* revealed by RNA-Seq analysis. *BMC Genomics*.
- Silva, J. A. D.; Lobo, I. K. C.; Souza, A.; Silva, A. F. D.; Sousa, N. R.; Gasparotto, L.; Hanada, R. E.; Nascimento Filho, F. J. do; Silva, G. F. D. 2013. Variabilidade genética de *Fusarium*

- decemcellulare isolado de três diferentes sintomas em guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). *Anais do 46º Congresso Brasileiro de Fitopatologia*, Resumo: 57-2.
- Silva, G. F.; Lobo, I. K. C.; Souza, A.; Silva, A.; Sousa, N.; Hanada, R. E. 2013b. PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) can be used for species identification from *Fusarium decemcellulare* complex. *Anais do 46º Congresso Brasileiro de Fitopatologia*, Resumo: 649-1.
- Silva, A. F.; Silva, J. A.; Sousa, N. R.; Nascimento Filho, F. J. do; Hanada, R. E.; Silva, G. F. 2013c. Selection of inter-simple sequence repeat (ISSR) marker for molecular diversity of *Fusarium decemcellulare* from guaraná-tree. *Anais do 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia*, Resumo: 2207-1.
- Singh, R. S.; Thakur, S. 2014. Antimicrobial activity and carbohydrate specificity of new mycelial lectins from *Fusarium* sp. *Biologia*, 69(10): 1295-1302.
- Souza, M. M. 2011. *A religiosidade do guaraná na cultura dos Sateré-Maué*. Dissertação de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Goiânia, Goiás. 80p.
- Spaepen, S.; Vanderleyden, J.; Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4): 425-448.
- Splivallo, R.; Fischer, U.; Göbel, C.; Feussner, I.; Karlovsky, P. 2009. Truffles Regulate Plant Root Morphogenesis via the Production of Auxin and Ethylene. *Plant Physiology*, 150: 2018-2029.
- Staswick, P. E.; Serban, B.; Rowe, M.; Tiryaki, I.; Maldonado, M. T.; Maldonado, M. C.; Suza, W. 2005. Characterization of an *Arabidopsis* Enzyme Family That Conjugates Amino Acids to Indole-3-Acetic Acid. *The Plant Cell*, 17: 616-627.

- Straka, J. R.; Hayward, A. R.; Emery, N. 2010. Gall-inducing *Pachypsylla celtidis* (Psyllidae) infiltrate hackberry trees with high concentrations of phytohormones. *Journal of Plant Interactions*, 5(3): 197-203.
- Tanaka, E.; Koga, H.; Mori, M.; Mori, M. 2011. Auxin Production by the Rice Blast Fungus and its Localization in Host Tissue. *Journal of Phytopathology*, 159: 522-530.
- Tavares, A. M.; Atroch, A. L.; do Nascimento Filho, F. J.; Pereira, J. C. R.; Araújo, J. C. A.; Moraes, L. A. C.; Santos, L. P.; Garcia, M. V. B.; de Arruda, M. R.; Sousa, N. R.; Ângelo, P. C. S. 2005. Sistemas de Produção – Cultura do Guaranazeiro no Amazonas (4ª Ed.). Disponível em: http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAA-2009-09/14953/1/Sistema_Prod_Guarana.pdf. Acesso em 13/02/2015.
- Teixeira, P. J. P. L.; Thomazella, D. P. T.; Reis, O.; do Prado, P. F. V.; do Rio, M. C. S.; Fiorin, G. L.; José, J.; Costa, G. G. L.; Negri, V. A.; Mondego, J. M. C.; Mieczkowski, P.; Pereira, G. A. G. High-Resolution Transcript Profiling of the Atypical Biotrophic Interaction between *Theobroma cacao* and the Fungal Pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *The Plant Cell*.
- Tfouni, S. A. V.; Camargo, M. C. R.; Vitorino, S. H. P.; Menegário, T. F. Toledo, M. C. F. 2007. Contribuição do guaraná em pó (*Paullinia cupana*) como fonte de cafeína na dieta. *Revista de Nutrição*, 20(1): 63-68.
- Thakur, K.; Chawla, V.; Bhatti, S.; Swarnkar, M. K.; Kaur, J.; Shankar, R.; Jha, G. 2013. De Novo Transcriptome Sequencing and Analysis for *Venturia inaequalis*, the Devastating Apple Scab Pathogen. *Plos One*, 8(1): 1-16.
- Tooker, J. F.; De Moraes, C. M. 2011. Feeding by Hessian Fly (*Mayetiola destructor* [Say]) Larvae on Wheat Increases Levels of Fatty Acids and Indole-3-Acetic Acid but not Hormones Involved in Plant-Defense Signaling. *Journal of Plant Growth Regulation*, 30(2): 158-165.

- Trapnell, C.; Williams, B. A.; Pertea, G.; Mortazavi, A.; Kwan, G.; van Baren, M. J.; Salzberg, S. L.; Wold, B. J.; Pachter, L. 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 28: 511-515.
- Tsai, I. J.; Tanaka, E.; Masuya, H.; Tanaka, R.; Hirooka, Y.; Endoh, R.; Sahashi, N.; Kikuchi, T. 2014. *Genome Biol. Evol.*, 6(4): 861-872.
- Tsavkelova, E.; Oeser, B.; Oren-Young, L.; Israeli, M.; Sasson, Y.; Tudzynski, B.; Sharon, A. 2012. Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species. *Fungal Genetics and Biology*, 49: 48-57.
- Turecková, V.; Novák, O.; Strnad, M. 2009. Profiling ABA metabolites in *Nicotiana tabacum* L. leaves by ultra-performance liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta*, 80:390-399.
- Vandeputte, O.; Öden, S.; Mol, A.; Vereecke, D.; Goethals, K.; Jaziri, M. E.; Prinsen, E. 2005. Biosynthesis of Auxin by the Gram-Positive Phytopathogen *Rhodococcus fascians* Is Controlled by Compounds Specific to Infected Plant Tissues. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3): 1169-1177.
- Vasanthakumar, A.; McManus, P. S. 2004. Indole-3-Acetic Acid-Producing Bacteria Are Associated with Cranberry Stem Gall. *Phytopathology*, 94(11): 1164-1171.
- Vovlas, N.; Nico, A. I.; De Luca, F.; De Giorgi, C.; Castillo, P. 2007. Diagnosis and Molecular Variability of an Argentinean Population of *Nacobbus aberrans* with Some Observations on Histopathology in Tomato. *Journal of Nematology*, 39(1): 17-26.
- Vicente, L. P.; de la Parte, E. M.; Pérez, T. C. 2012. First report in Cuba of Green Point Gall of Cocoa Cushion caused by *Albonectria rigidiuscula* (*Fusarium decemcellulare*). *Fitosanidad*, 16(1): 19-25.

- Xin, X-F.; He, S. Y. 2013. *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: A Model Pathogen for Probing Disease Susceptibility and Hormone Signaling in Plants. *Annual Review of Phytopathology*, 51: 473-498.
- Xu, C.; Chen, H.; Gleason, M. L.; Xu, J-R.; Liu, H.; Zhang, R.; Sun, G. 2016. *Peltaster fructicola* genome reveals evolution from an invasive phytopathogen to an ectophytic parasite. *Scientific Reports*, 6.
- Waalwijk, C.; van der Lee, T.; de Vries, I.; Hesselink, T.; Arts, J.; Kema, G. H. J. 2004. Synteny in toxigenic *Fusarium* species: The fumonisin gene cluster and the mating type region as examples. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 533-544.
- Wani, S. H.; Kumar, V.; Shriram, V.; Sah, S. K. 2016. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal*.
- Wolf, J. B. W. 2013. Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial. *Molecular Ecology Resources*, 13: 559-572.
- Woodward, A. W.; Bartel, B. 2005. Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany*, 95: 707-735.
- Yamaguchi, H.; Tanaka, H.; Hasegawa, M.; Tokuda, M.; Asami, T.; Suzuki, Y. 2012. Phytohormones and willow gall induction by a gall-inducing sawfly. *New Phytologist*, 196: 568-595.
- Yamaguti-Sasaki, E.; Ito, L. A.; Canteli, V. C. D.; Ushirobira, T. M. A.; Ueda-Nakamura, T.; Filho, B. P. D.; Nakamura, C. V.; de Mello, J. C. P. 2007. Antioxidant Capacity and *In Vitro* Prevention of Dental Plaque Formation by Extracts and Condensed Tannins of *Paullinia cupana*. *Molecules*, 12(8): 1950-1953.

- Yang, S.; Zhang, Q.; Guo, J.; Charkowski, A. O.; Glick, B. R.; Ibekwe, M.; Cooksey, D. A.; Yang, C.-H. 2007. Global Effect of Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis on Multiple Virulence Factors of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4): 1079-1088.
- Ying, C.; Park, J.-J.; Gang, D. R.; Hulbert, S. H. 2014. Characterization of a Tryptophan 2-Monooxygenase Gene from *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Involved in Auxin Biosynthesis and Rust Pathogenicity. *The American Phytopathology Society*, 27(3): 227-235.
- Zhao, Y.; Christensen, S. K.; Fankhauser, C.; Cashman, J. R.; Cohen, J. D.; Weigel, D.; Chory, J. 2001. A Role for Flavin Monooxygenase-Like Enzymes in Auxin Biosynthesis. *Science*, 291: 306-309.

10. ANEXOS

Box 1 | Comandos do Trimmomatic-0.33.

```
echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/13_CCGTCC_L002_R1_001.fast
q
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/13_CCGTCC_L002_R2_001.fast
q 13_CCGTCC_L002_R1_001_PAISED.fastq 13_CCGTCC_L002_R1_001_UNPAISED.fastq
13_CCGTCC_L002_R2_001_PAISED.fastq 13_CCGTCC_L002_R2_001_UNPAISED.fastq
ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25 TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15
MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p1
```

```
echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/13_CCGTCC_L002_R1_002.fast
q
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/13_CCGTCC_L002_R2_002.fast
q 13_CCGTCC_L002_R1_002_PAISED.fastq 13_CCGTCC_L002_R1_002_UNPAISED.fastq
13_CCGTCC_L002_R2_002_PAISED.fastq 13_CCGTCC_L002_R2_002_UNPAISED.fastq
ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25 TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15
MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p2
```

```
echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/13_CCGTCC_L002_R1_003.fast
q
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/13_CCGTCC_L002_R2_003.fast
q 13_CCGTCC_L002_R1_003_PAISED.fastq 13_CCGTCC_L002_R1_003_UNPAISED.fastq
13_CCGTCC_L002_R2_003_PAISED.fastq 13_CCGTCC_L002_R2_003_UNPAISED.fastq
ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25 TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15
MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p3
```

```
echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/13_CCGTCC_L002_R1_004.fast
q
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/13_CCGTCC_L002_R2_004.fast
q 13_CCGTCC_L002_R1_004_PAISED.fastq 13_CCGTCC_L002_R1_004_UNPAISED.fastq
13_CCGTCC_L002_R2_004_PAISED.fastq 13_CCGTCC_L002_R2_004_UNPAISED.fastq
ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25 TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15
MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p4
```

```

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
19_CGATGT_L002_R1_001.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
19_CGATGT_L002_R2_001.fastq 19_CGATGT_L002_R1_001_PAISED.fastq
19_CGATGT_L002_R1_001_UNPAIRED.fastq 19_CGATGT_L002_R2_001_PAISED.fastq
19_CGATGT_L002_R2_001_UNPAIRED.fastq ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25
TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p5

```

```

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
19_CGATGT_L002_R1_002.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
19_CGATGT_L002_R2_002.fastq 19_CGATGT_L002_R1_002_PAISED.fastq
19_CGATGT_L002_R1_002_UNPAIRED.fastq 19_CGATGT_L002_R2_002_PAISED.fastq
19_CGATGT_L002_R2_002_UNPAIRED.fastq ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25
TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p6

```

```

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
19_CGATGT_L002_R1_003.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
19_CGATGT_L002_R2_003.fastq 19_CGATGT_L002_R1_003_PAISED.fastq
19_CGATGT_L002_R1_003_UNPAIRED.fastq 19_CGATGT_L002_R2_003_PAISED.fastq
19_CGATGT_L002_R2_003_UNPAIRED.fastq ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25
TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p7

```

```

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
19_CGATGT_L002_R1_004.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
19_CGATGT_L002_R2_004.fastq 19_CGATGT_L002_R1_004_PAISED.fastq
19_CGATGT_L002_R1_004_UNPAIRED.fastq 19_CGATGT_L002_R2_004_PAISED.fastq
19_CGATGT_L002_R2_004_UNPAIRED.fastq ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25
TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p8

```

```

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
19_CGATGT_L002_R1_005.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/

```

```

19_CGATGT_L002_R2_005.fastq          19_CGATGT_L002_R1_005_PAISED.fastq
19_CGATGT_L002_R1_005_UNPAIRED.fastq  19_CGATGT_L002_R2_005_PAISED.fastq
19_CGATGT_L002_R2_005_UNPAIRED.fastq ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25
TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p9

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
21_GTGAAA_L002_R1_001.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
21_GTGAAA_L002_R2_001.fastq          21_GTGAAA_L002_R1_001_PAISED.fastq
21_GTGAAA_L002_R1_001_UNPAIRED.fastq  21_GTGAAA_L002_R2_001_PAISED.fastq
21_GTGAAA_L002_R2_001_UNPAIRED.fastq ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25
TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p10

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
21_GTGAAA_L002_R1_002.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
21_GTGAAA_L002_R2_002.fastq          21_GTGAAA_L002_R1_002_PAISED.fastq
21_GTGAAA_L002_R1_002_UNPAIRED.fastq  21_GTGAAA_L002_R2_002_PAISED.fastq
21_GTGAAA_L002_R2_002_UNPAIRED.fastq ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25
TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p11

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
21_GTGAAA_L002_R1_003.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
21_GTGAAA_L002_R2_003.fastq          21_GTGAAA_L002_R1_003_PAISED.fastq
21_GTGAAA_L002_R1_003_UNPAIRED.fastq  21_GTGAAA_L002_R2_003_PAISED.fastq
21_GTGAAA_L002_R2_003_UNPAIRED.fastq ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25
TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p12

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
21_GTGAAA_L002_R1_004.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
21_GTGAAA_L002_R2_004.fastq          21_GTGAAA_L002_R1_004_PAISED.fastq
21_GTGAAA_L002_R1_004_UNPAIRED.fastq  21_GTGAAA_L002_R2_004_PAISED.fastq
21_GTGAAA_L002_R2_004_UNPAIRED.fastq ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25
TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p13

```



```

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
2241_BD_ATGTCA_L002_R1_001.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
2241_BD_ATGTCA_L002_R2_001.fastq          2241_BD_ATGTCA_L002_R1_001_PAISED.fastq
2241_BD_ATGTCA_L002_R1_001_UNPAISED.fastq
2241_BD_ATGTCA_L002_R2_001_PAISED.fastq
2241_BD_ATGTCA_L002_R2_001_UNPAISED.fastq          ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10
LEADING:25 TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p14

```

```

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
2241_BD_ATGTCA_L002_R1_002.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
2241_BD_ATGTCA_L002_R2_002.fastq          2241_BD_ATGTCA_L002_R1_002_PAISED.fastq
2241_BD_ATGTCA_L002_R1_002_UNPAISED.fastq
2241_BD_ATGTCA_L002_R2_002_PAISED.fastq
2241_BD_ATGTCA_L002_R2_002_UNPAISED.fastq          ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10
LEADING:25 TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p15

```

```

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
2241_BD_ATGTCA_L002_R1_003.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
2241_BD_ATGTCA_L002_R2_003.fastq          2241_BD_ATGTCA_L002_R1_003_PAISED.fastq
2241_BD_ATGTCA_L002_R1_003_UNPAISED.fastq
2241_BD_ATGTCA_L002_R2_003_PAISED.fastq
2241_BD_ATGTCA_L002_R2_003_UNPAISED.fastq          ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10
LEADING:25 TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p16

```

```

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
2241_BD_ATGTCA_L002_R1_004.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
2241_BD_ATGTCA_L002_R2_004.fastq          2241_BD_ATGTCA_L002_R1_004_PAISED.fastq
2241_BD_ATGTCA_L002_R1_004_UNPAISED.fastq
2241_BD_ATGTCA_L002_R2_004_PAISED.fastq
2241_BD_ATGTCA_L002_R2_004_UNPAISED.fastq          ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10
LEADING:25 TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p17

```

```

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/

```

```

2241_MS_CAGATC_L002_R1_001.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
2241_MS_CAGATC_L002_R2_001.fastq          2241_MS_CAGATC_L002_R1_001_PAISED.fastq
2241_MS_CAGATC_L002_R1_001_UNPAIRED.fastq
2241_MS_CAGATC_L002_R2_001_PAISED.fastq
2241_MS_CAGATC_L002_R2_001_UNPAIRED.fastq          ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10
LEADING:25 TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p18

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/24_GTCCGC_L002_R1_001.fas
tq          /projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
24_GTCCGC_L002_R2_001.fastq          24_GTCCGC_L002_R1_001_PAISED.fastq
24_GTCCGC_L002_R1_001_UNPAIRED.fastq          24_GTCCGC_L002_R2_001_PAISED.fastq
24_GTCCGC_L002_R2_001_UNPAIRED.fastq ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25
TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p19

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/24_GTCCGC_L002_R1_002.fas
tq          /projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
24_GTCCGC_L002_R2_002.fastq          24_GTCCGC_L002_R1_002_PAISED.fastq
24_GTCCGC_L002_R1_002_UNPAIRED.fastq          24_GTCCGC_L002_R2_002_PAISED.fastq
24_GTCCGC_L002_R2_002_UNPAIRED.fastq ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25
TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p20

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/24_GTCCGC_L002_R1_003.fas
tq          /projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
24_GTCCGC_L002_R2_003.fastq          24_GTCCGC_L002_R1_003_PAISED.fastq
24_GTCCGC_L002_R1_003_UNPAIRED.fastq          24_GTCCGC_L002_R2_003_PAISED.fastq
24_GTCCGC_L002_R2_003_UNPAIRED.fastq ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25
TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p21

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/24_GTCCGC_L002_R1_004.fas
tq          /projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
24_GTCCGC_L002_R2_004.fastq          24_GTCCGC_L002_R1_004_PAISED.fastq
24_GTCCGC_L002_R1_004_UNPAIRED.fastq          24_GTCCGC_L002_R2_004_PAISED.fastq
24_GTCCGC_L002_R2_004_UNPAIRED.fastq ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25
TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p22

```

```

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
272_BD_ACAGTG_L002_R1_001.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
272_BD_ACAGTG_L002_R2_001.fastq          272_BD_ACAGTG_L002_R1_001_PAIREd.fastq
272_BD_ACAGTG_L002_R1_001_UNPAIRED.fastq
272_BD_ACAGTG_L002_R2_001_PAIREd.fastq
272_BD_ACAGTG_L002_R2_001_UNPAIRED.fastq          ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10
LEADING:25 TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p23

```

```

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
272_BD_ACAGTG_L002_R1_002.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
272_BD_ACAGTG_L002_R2_002.fastq          272_BD_ACAGTG_L002_R1_002_PAIREd.fastq
272_BD_ACAGTG_L002_R1_002_UNPAIRED.fastq
272_BD_ACAGTG_L002_R2_002_PAIREd.fastq
272_BD_ACAGTG_L002_R2_002_UNPAIRED.fastq          ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10
LEADING:25 TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p24

```

```

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
272_BD_ACAGTG_L002_R1_003.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
272_BD_ACAGTG_L002_R2_003.fastq          272_BD_ACAGTG_L002_R1_003_PAIREd.fastq
272_BD_ACAGTG_L002_R1_003_UNPAIRED.fastq
272_BD_ACAGTG_L002_R2_003_PAIREd.fastq
272_BD_ACAGTG_L002_R2_003_UNPAIRED.fastq          ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10
LEADING:25 TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p25

```

```

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
272_BD_ACAGTG_L002_R1_004.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
272_BD_ACAGTG_L002_R2_004.fastq          272_BD_ACAGTG_L002_R1_004_PAIREd.fastq
272_BD_ACAGTG_L002_R1_004_UNPAIRED.fastq
272_BD_ACAGTG_L002_R2_004_PAIREd.fastq
272_BD_ACAGTG_L002_R2_004_UNPAIRED.fastq          ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10
LEADING:25 TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p26

```

```

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/

```

```

272_MS_GCCAAT_L002_R1_001.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
272_MS_GCCAAT_L002_R2_001.fastq          272_MS_GCCAAT_L002_R1_001_PAISED.fastq
272_MS_GCCAAT_L002_R1_001_UNPAIRED.fastq 272_MS_GCCAAT_L002_R2_001_PAISED.fastq
272_MS_GCCAAT_L002_R2_001_UNPAIRED.fastq ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10
LEADING:25 TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p27

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
272_MS_GCCAAT_L002_R1_002.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
272_MS_GCCAAT_L002_R2_002.fastq          272_MS_GCCAAT_L002_R1_002_PAISED.fastq
272_MS_GCCAAT_L002_R1_002_UNPAIRED.fastq 272_MS_GCCAAT_L002_R2_002_PAISED.fastq
272_MS_GCCAAT_L002_R2_002_UNPAIRED.fastq ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10
LEADING:25 TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p28

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
27_AGTCAA_L002_R1_001.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
27_AGTCAA_L002_R2_001.fastq          27_AGTCAA_L002_R1_001_PAISED.fastq
27_AGTCAA_L002_R1_001_UNPAIRED.fastq    27_AGTCAA_L002_R2_001_PAISED.fastq
27_AGTCAA_L002_R2_001_UNPAIRED.fastq ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25
TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p29

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
27_AGTCAA_L002_R1_002.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
27_AGTCAA_L002_R2_002.fastq          27_AGTCAA_L002_R1_002_PAISED.fastq
27_AGTCAA_L002_R1_002_UNPAIRED.fastq    27_AGTCAA_L002_R2_002_PAISED.fastq
27_AGTCAA_L002_R2_002_UNPAIRED.fastq ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25
TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p30

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
27_AGTCAA_L002_R1_003.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
27_AGTCAA_L002_R2_003.fastq          27_AGTCAA_L002_R1_003_PAISED.fastq
27_AGTCAA_L002_R1_003_UNPAIRED.fastq    27_AGTCAA_L002_R2_003_PAISED.fastq
27_AGTCAA_L002_R2_003_UNPAIRED.fastq ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25
TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p32

```

```

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
27_AGTCAA_L002_R1_004.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
27_AGTCAA_L002_R2_004.fastq                27_AGTCAA_L002_R1_004_PAIRED.fastq
27_AGTCAA_L002_R1_004_UNPAIRED.fastq        27_AGTCAA_L002_R2_004_PAIRED.fastq
27_AGTCAA_L002_R2_004_UNPAIRED.fastq ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25
TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p33

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
307_TGACCA_L002_R1_001.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
307_TGACCA_L002_R2_001.fastq                307_TGACCA_L002_R1_001_PAIRED.fastq
307_TGACCA_L002_R1_001_UNPAIRED.fastq        307_TGACCA_L002_R2_001_PAIRED.fastq
307_TGACCA_L002_R2_001_UNPAIRED.fastq        ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10
LEADING:25 TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p34

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
307_TGACCA_L002_R1_002.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
307_TGACCA_L002_R2_002.fastq                307_TGACCA_L002_R1_002_PAIRED.fastq
307_TGACCA_L002_R1_002_UNPAIRED.fastq        307_TGACCA_L002_R2_002_PAIRED.fastq
307_TGACCA_L002_R2_002_UNPAIRED.fastq        ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10
LEADING:25 TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p35

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
307_TGACCA_L002_R1_003.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
307_TGACCA_L002_R2_003.fastq                307_TGACCA_L002_R1_003_PAIRED.fastq
307_TGACCA_L002_R1_003_UNPAIRED.fastq        307_TGACCA_L002_R2_003_PAIRED.fastq
307_TGACCA_L002_R2_003_UNPAIRED.fastq        ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10
LEADING:25 TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p36

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
307_TGACCA_L002_R1_004.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/

```

```

307_TGACCA_L002_R2_004.fastq          307_TGACCA_L002_R1_004_PAISED.fastq
307_TGACCA_L002_R1_004_UNPAIRED.fastq  307_TGACCA_L002_R2_004_PAISED.fastq
307_TGACCA_L002_R2_004_UNPAIRED.fastq    ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10
LEADING:25 TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p37

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
30_CTTGTA_L002_R1_001.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
30_CTTGTA_L002_R2_001.fastq          30_CTTGTA_L002_R1_001_PAISED.fastq
30_CTTGTA_L002_R1_001_UNPAIRED.fastq  30_CTTGTA_L002_R2_001_PAISED.fastq
30_CTTGTA_L002_R2_001_UNPAIRED.fastq ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25
TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p38

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
30_CTTGTA_L002_R1_002.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
30_CTTGTA_L002_R2_002.fastq          30_CTTGTA_L002_R1_002_PAISED.fastq
30_CTTGTA_L002_R1_002_UNPAIRED.fastq  30_CTTGTA_L002_R2_002_PAISED.fastq
30_CTTGTA_L002_R2_002_UNPAIRED.fastq ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25
TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p39

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
30_CTTGTA_L002_R1_003.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
30_CTTGTA_L002_R2_003.fastq          30_CTTGTA_L002_R1_003_PAISED.fastq
30_CTTGTA_L002_R1_003_UNPAIRED.fastq  30_CTTGTA_L002_R2_003_PAISED.fastq
30_CTTGTA_L002_R2_003_UNPAIRED.fastq ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25
TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p40

echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
30_CTTGTA_L002_R1_004.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/
30_CTTGTA_L002_R2_004.fastq          30_CTTGTA_L002_R1_004_PAISED.fastq
30_CTTGTA_L002_R1_004_UNPAIRED.fastq  30_CTTGTA_L002_R2_004_PAISED.fastq
30_CTTGTA_L002_R2_004_UNPAIRED.fastq ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25
TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15 MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p41

```



```
echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/5_AGTTCC_L002_R1_001.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/5_AGTTCC_L002_R2_001.fastq
5_AGTTCC_L002_R1_001_PAISED.fastq          5_AGTTCC_L002_R1_001_UNPAISED.fastq
5_AGTTCC_L002_R2_001_PAISED.fastq          5_AGTTCC_L002_R2_001_UNPAISED.fastq
ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25 TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15
MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p42
```

```
echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/5_AGTTCC_L002_R1_002.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/5_AGTTCC_L002_R2_002.fastq
5_AGTTCC_L002_R1_002_PAISED.fastq          5_AGTTCC_L002_R1_002_UNPAISED.fastq
5_AGTTCC_L002_R2_002_PAISED.fastq          5_AGTTCC_L002_R2_002_UNPAISED.fastq
ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25 TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15
MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p43
```

```
echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/5_AGTTCC_L002_R1_003.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/5_AGTTCC_L002_R2_003.fastq
5_AGTTCC_L002_R1_003_PAISED.fastq          5_AGTTCC_L002_R1_003_UNPAISED.fastq
5_AGTTCC_L002_R2_003_PAISED.fastq          5_AGTTCC_L002_R2_003_UNPAISED.fastq
ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25 TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15
MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p44
```

```
echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/5_AGTTCC_L002_R1_004.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/5_AGTTCC_L002_R2_004.fastq
5_AGTTCC_L002_R1_004_PAISED.fastq          5_AGTTCC_L002_R1_004_UNPAISED.fastq
5_AGTTCC_L002_R2_004_PAISED.fastq          5_AGTTCC_L002_R2_004_UNPAISED.fastq
ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25 TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15
MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p45
```

```
echo "java -jar /home/michel/programas/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar PE -threads 8
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/5_AGTTCC_L002_R1_005.fastq
/projects/FusariumDecemcellulare/data/raw.data/RNASeq/janeiro_2016/5_AGTTCC_L002_R2_005.fastq
5_AGTTCC_L002_R1_005_PAISED.fastq          5_AGTTCC_L002_R1_005_UNPAISED.fastq
5_AGTTCC_L002_R2_005_PAISED.fastq          5_AGTTCC_L002_R2_005_UNPAISED.fastq
ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25 TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:25:15
MINLEN:50" | qsub -cwd -q all.q -N p46
```

Box 2 | Comando do Bowtie2-build

```
echo "bowtie2-build -f F307_assembly_V7_pacbio_illumina.fasta idx_F307" | qsub -cwd -N idx307
```

Comandos do TopHat2

```
echo "tophat2 -p 20 -r 0 --mate-std-dev=80 -o 13_thout_307 idx_F307 13_R1_PAired 13_R2_PAired,13_UNPAired" | qsub -cwd -N th13.307
```

```
echo "tophat2 -p 20 -r 0 --mate-std-dev=80 -o 19_thout_307 idx_F307 19_R1_PAired 19_R2_PAired,19_UNPAired" | qsub -cwd -N th19.307
```

```
echo "tophat2 -p 20 -r 0 --mate-std-dev=80 -o 21_thout_307 idx_F307 21_R1_PAired 21_R2_PAired,21_UNPAired" | qsub -cwd -N th21.307
```

```
echo "tophat2 -p 20 -r 0 --mate-std-dev=80 -o 2241BD_thout_307 idx_F307 2241BD_R1_PAired 2241BD_R2_PAired,2241BD_UNPAired" | qsub -cwd -N th2241BD.307
```

```
echo "tophat2 -p 20 -r 0 --mate-std-dev=80 -o 2241MS_thout_307 idx_F307 2241MS_R1_PAired 2241MS_R2_PAired,2241MS_UNPAired" | qsub -cwd -N th2241MS.307
```

```
echo "tophat2 -p 20 -r 0 --mate-std-dev=80 -o 24_thout_307 idx_F307 24_R1_PAired 24_R2_PAired,24_UNPAired" | qsub -cwd -N th24.307
```

```
echo "tophat2 -p 20 -r 0 --mate-std-dev=80 -o 272BD_thout_307 idx_F307 272BD_R1_PAired 272BD_R2_PAired,272BD_UNPAired" | qsub -cwd -N th272BD.307
```

```
echo "tophat2 -p 20 -r 0 --mate-std-dev=80 -o 272MS_thout_307 idx_F307 272MS_R1_PAired 272MS_R2_PAired,272MS_UNPAired" | qsub -cwd -N th272MS.307
```

```
echo "tophat2 -p 20 -r 0 --mate-std-dev=80 -o 27_thout_307 idx_F307 27_R1_PAired 27_R2_PAired,27_UNPAired" | qsub -cwd -N th27.307
```



```
echo "tophat2 -p 20 -r 0 --mate-std-dev=80 -o 307_thout_307 idx_F307 307_R1_PAired
307_R2_PAired,307_UNPAired" | qsub -cwd -N th307.307
```

```
echo "tophat2 -p 20 -r 0 --mate-std-dev=80 -o 30_thout_307 idx_F307 30_R1_PAired
30_R2_PAired,30_UNPAired" | qsub -cwd -N th30.307
```

```
echo "tophat2 -p 20 -r 0 --mate-std-dev=80 -o 5_thout_307 idx_F307 5_R1_PAired
5_R2_PAired,5_UNPAired" | qsub -cwd -N th5.307
```

Comandos do Cufflinks

```
echo "cufflinks -p 40 -o 13_clout_307 13_thout_307/accepted_hits.bam" | qsub -cwd -V -q all.q -N
cuff_13_307
```

```
echo "cufflinks -p 40 -o 19_clout_307 19_thout_307/accepted_hits.bam" | qsub -cwd -V -q all.q -N
cuff_19_307
```

```
echo "cufflinks -p 40 -o 21_clout_307 21_thout_307/accepted_hits.bam" | qsub -cwd -V -q all.q -N
cuff_21_307
```

```
echo "cufflinks -p 40 -o 2241BD_clout_307 2241BD_thout_307/accepted_hits.bam" | qsub -cwd -V -q all.q
-N cuff_2241BD_307
```

```
echo "cufflinks -p 40 -o 2241MS_clout_307 2241MS_thout_307/accepted_hits.bam" | qsub -cwd -V -q all.q
-N cuff_2241MS_307
```

```
echo "cufflinks -p 40 -o 24_clout_307 24_thout_307/accepted_hits.bam" | qsub -cwd -V -q all.q -N
cuff_24_307
```

```
echo "cufflinks -p 40 -o 272BD_clout_307 272BD_thout_307/accepted_hits.bam" | qsub -cwd -V -q all.q -
N cuff_272BD_307
```

```
echo "cufflinks -p 40 -o 272MS_clout_307 272MS_thout_307/accepted_hits.bam" | qsub -cwd -V -q all.q -
N cuff_272MS_307
```

```
echo "cufflinks -p 40 -o 27_clout_307 27_thout_307/accepted_hits.bam"| qsub -cwd -V -q all.q -N cuff_27_307
```

```
echo "cufflinks -p 40 -o 307_clout_307 307_thout_307/accepted_hits.bam"| qsub -cwd -V -q all.q -N cuff_307_307
```

```
echo "cufflinks -p 40 -o 30_clout_307 30_thout_307/accepted_hits.bam"| qsub -cwd -V -q all.q -N cuff_30_307
```

```
echo "cufflinks -p 40 -o 5_clout_307 5_thout_307/accepted_hits.bam"| qsub -cwd -V -q all.q -N cuff_5_307
```

Comandos do Cuffmerge

O Cuffmerge precisa antes de um arquivo “.txt”, contendo os caminhos para os transcritos montados pelo Cufflinks, que serão utilizados na montagem do transcriptoma final:

assemblies BD 307 HExHO t.txt:

```
/projects/FusariumDecemcellulare/workspace/cufflinks_fdc/27_clout_307/transcripts.gtf  
/projects/FusariumDecemcellulare/workspace/cufflinks_fdc/307_clout_307/transcripts.gtf  
/projects/FusariumDecemcellulare/workspace/cufflinks_fdc/272BD_clout_307/transcripts.gtf  
/projects/FusariumDecemcellulare/workspace/cufflinks_fdc/19_clout_307/transcripts.gtf  
/projects/FusariumDecemcellulare/workspace/cufflinks_fdc/21_clout_307/transcripts.gtf  
/projects/FusariumDecemcellulare/workspace/cufflinks_fdc/2241BD_clout_307/transcripts.gtf
```

assemblies MS 307 HExHO t.txt:

```
/projects/FusariumDecemcellulare/workspace/cufflinks_fdc/24_clout_307/transcripts.gtf  
/projects/FusariumDecemcellulare/workspace/cufflinks_fdc/5_clout_307/transcripts.gtf  
/projects/FusariumDecemcellulare/workspace/cufflinks_fdc/272MS_clout_307/transcripts.gtf  
/projects/FusariumDecemcellulare/workspace/cufflinks_fdc/13_clout_307/transcripts.gtf  
/projects/FusariumDecemcellulare/workspace/cufflinks_fdc/30_clout_307/transcripts.gtf
```

```
/projects/FusariumDecemcellulare/workspace/cufflinks_fdc/2241MS_clout_307/transcripts.gtf
```

```
echo cuffmerge --keep-tmp -p 20 -o merge_BD_307_HExHO assemblies_BD_307_HExHO_t.txt | qsub -  
cwd -V -q all.q@n007 -N mHExHOB307
```

```
echo cuffmerge --keep-tmp -p 20 -o merge_MS_307_HExHO assemblies_MS_307_HExHO_t.txt | qsub -  
cwd -V -q all.q@n007 -N mHExHOMS307
```

Comandos do Cuffdiff

```
echo "cuffdiff -o diff_BD_307_HExHO -b F307_assembly_V7_pacbio_illumina_col60.fasta -p 15 -L  
Heterotalicos,Homotalicos -u ../cuffmerge_fdc/Analise_2_HExHO/Merge_307_HEx
```

```
HO/merge_BD_307_HExHO/merged.gtf
```

```
../cufflinks_fdc/27_thout_307/accepted_hits.bam,../cufflinks_fdc/307_thout_307/accepted_hits.bam,../cuf  
flinks_fdc/272BD_thout_307/accep
```

```
ted_hits.bam
```

```
../cufflinks_fdc/19_thout_307/accepted_hits.bam,../cufflinks_fdc/21_thout_307/accepted_hits.bam,../cuffl  
inks_fdc/2241BD_thout_307/accepted_hits.bam" | qsub
```

```
-cwd -V -q all.q -N diffBD3HExHO
```

```
echo "cuffdiff -o diff_MS_307_HExHO -b F307_assembly_V7_pacbio_illumina_col60.fasta -p 15 -L  
Heterotalicos,Homotalicos -u ../cuffmerge_fdc/Analise_2_HExHO/Merge_307_HEx
```

```
HO/merge_MS_307_HExHO/merged.gtf
```

```
../cufflinks_fdc/24_thout_307/accepted_hits.bam,../cufflinks_fdc/5_thout_307/accepted_hits.bam,../cuffli  
nks_fdc/272MS_thout_307/accepte
```

```
d_hits.bam
```

```
../cufflinks_fdc/13_thout_307/accepted_hits.bam,../cufflinks_fdc/30_thout_307/accepted_hits.bam,../cuffl  
inks_fdc/2241MS_thout_307/accepted_hits.bam" | qsub -
```

```
cwd -V -q all.q -N diffMS3HExHO
```

Figura A1 – Seção 6. Discussão

Cromossomo 5 de FDC307

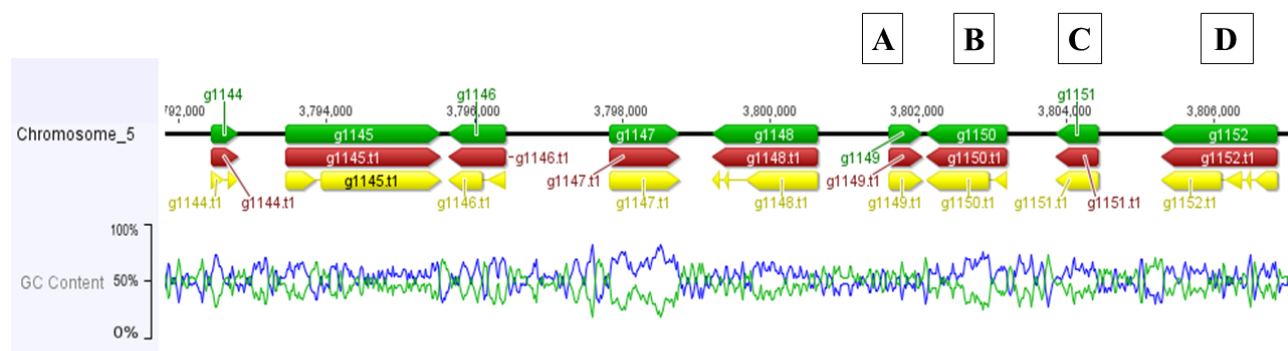


Figura A1. Aminociclopropano deaminase no cromossomo 5 do isolado FDC307. **A:** Putativa thiorredoxina. **B:** Putativa aminociclopropano (ACC) deaminase. **C:** Proteína hipotética. **D:** Putativa peroxigenase aromática.